

JPW

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the U.S. Postal Service with sufficient postage as First Class Mail, in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450, on the date shown below.

Dated: February 7, 2005

Signature:

Shawn P. Foley
(Shawn P. Foley)

Docket No.:
MAIWAL 3.9-002 CONT
(PATENT)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:
Ellinger et al.

Application No.: 10/789,081

Group Art Unit: 1743

Filed: February 27, 2004

Examiner: Not Yet
Assigned

For INTERACTION DETECTION ON SEVERAL
: PROBE ARRAYS

CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Germany	101 42 643.7	August 31, 2001

In support of this claim, a certified copy of the original foreign application is filed herewith.

Dated: February 7, 2005

Respectfully submitted,

By Shawn P. Foley
Shawn P. Foley

Registration No.: 33,071
LERNER, DAVID, LITTENBERG,
KRUMHOLZ & MENTLIK, LLP
600 South Avenue West
Westfield, New Jersey 07090
(908) 654-5000
Attorney for Applicant

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 42 643.7

Anmeldetag: 31. August 2001

Anmelder/Inhaber: Clondia Chip Technologies GmbH,
07743 Jena/DE

Bezeichnung: Detektion von Wechselwirkungen auf Sonden-Arrays

IPC: C 07 H, C 12 Q, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. Januar 2005
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hoiß

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

BEST AVAILABLE COPY

München · Hamburg · Düsseldorf

Patentanwälte

Dr. Walter Maiwald (München)
Dr. Volker Hamm (Hamburg)
Dr. Stefan Michalski (Düsseldorf)
Dr. Regina Neuefeind (München)
Dipl.-Ing. Univ. Udo Preuss (München)

Rechtsanwalt
Stephan N. Schneller (München)

In Kooperation mit:
Dr. Schmidt-Felzmann & Koziarka
Rechtsanwälte
(Hamburg)

Parr · Tauche ·
Leutheusser-Schnarrenberger
Rechtsanwälte
(München · Starnberg)



Aktenzeichen
Neuanmeldung

Unser Zeichen
C 7220 / RN

CLONDIAG CHIP TECHNOLOGIES GMBH

München,
31. August 2001

CLONDIAG CHIP TECHNOLOGIES GMBH

Löbstedter Straße 105, 07743 Jena

Detektion von Wechselwirkungen auf Sonden-Arrays



Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Sondenmolekülen und Targetmolekülen auf Sonden-Arrays, bei dem auf die Markierung der Targetmoleküle verzichtet werden kann. Ferner betrifft die Erfindung für ein derartiges Verfahren geeignete Sonden-Arrays und Kits sowie ein Verfahren zur Herstellung und Qualitätsüberwachung von Sonden-Arrays.

Biomedizinische Tests basieren häufig auf der Feststellung der Wechselwirkung zwischen einem Molekül, das in bekannter Menge und Position vorhanden ist (der molekularen Sonde)


RN:MH:uh

und dem nachzuweisenden Molekül bzw. den nachzuweisenden Molekülen (dem molekularen Target). Moderne Tests werden in der Regel mit einer Probe parallel an einigen Sonden durchgeführt (D. J. Lockhart, E. A. Winzeler; Genomics, gene expression and DNA arrays; Nature 2000, 405, 827-836). Die Sonden werden hierbei üblicherweise in vorgegebener Art und Weise auf einer geeigneten, beispielsweise in WO 00/12575 beschriebenen Matrix immobilisiert (siehe z.B. US 5,412,087, WO 98/36827) bzw. synthetisch erzeugt (siehe z.B. US 5,143,854, US 5,658,734, WO 90/03382).


Der Nachweis einer solchen Wechselwirkung erfolgt üblicherweise folgendermaßen: Die Sonde bzw. die Sonden werden in vorgegebener Art und Weise an einer bestimmten Matrix fixiert. Die Targets werden in einer Lösung mit den Sonden in Kontakt gebracht und unter definierten Bedingungen inkubiert. In Folge der Inkubation findet zwischen Sonde und Target eine spezifische Wechselwirkung statt. Die entstehende Bindung ist deutlich stabiler als die Bindung von Molekülen, für die die Sonde unspezifisch ist. Anschließend wird das System mit entsprechenden Lösungen gewaschen, so daß die Moleküle, die nicht spezifisch gebunden sind, entfernt werden.

Zum Nachweis der Wechselwirkung zwischen Target und Sonde werden heute eine Vielzahl von Verfahren eingesetzt, von denen einige im folgenden beschrieben werden:

Als Nachweisverfahren, die auf einer Markierung des Targets beruhen, sind insbesondere Fluoreszenz-basierte Verfahren bekannt. Dabei werden die Targets vor, nach oder im Verlauf der spezifischen Interaktion mit den Sonden mit fluoreszierenden Markern versehen. So werden Analysen basierend auf hochintegrierten Sonden-Arrays u.a. wegen hoher Ortsauflösung und im Vergleich zu anderen herkömmlichen Methoden geringerem Aufwand in der Regel fluoreszenzoptisch ausgelesen (A. Marshall, J. Hodgson, DNA Chips: An array of possibilities, Nature Biotechnology 1998, 16, 27-31; G. Ramsay, DNA Chips: State of the Art, Nature Biotechnology 1998, 16, 40-44).



Für die effektive Markierung von Targets mit Fluorophoren sind verschiedene Verfahren bekannt. Einerseits werden Konjugate aus einem Fluorophor bzw. einer Ankergruppe für fluoreszierende Moleküle und einer reaktiven Gruppe genutzt, um Targets auf chemischem Wege zu markieren. Speziell für die Markierung von Nukleinsäuren sind verschiedene kommerzielle Produkte verfügbar, wie z.B. BiotinChemLink von Roche Biochemicals, Mannheim, Deutschland; Ulysis von Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA; Psoralen-Biotin von Ambion Inc., Austin, Texas, USA. Als Produkt des Prozesses entstehen Targets, die intern mit Substituenten modifiziert sind. Da letztere das Hybridisierungsverhalten der Targets in schwer voraussagbarer Weise beeinflussen, sind optimal stringente Hybridisierungsbedingungen, wie sie beispielsweise für die Detektion von Punktmutationen notwendig sind, schwieriger zu definieren.



Ferner werden enzymatische Aktivitäten genutzt, um Targetmoleküle mit Fluorophoren zu markieren. So werden beispielsweise Nukleinsäure-Targets mittels Polymerasen kopiert, wobei in die Kopie fluoreszierende Monomere bzw. mit Ankergruppen wie beispielsweise Biotin, Digoxigenin oder dergleichen gekoppelte Monomere eingebaut werden. In einer Weiterentwicklung dieses cDNA-Protokolls ist es möglich, für quantitative Array-Experimente zwei verschiedene Proben, nämlich die zu untersuchende Probe sowie eine Standardprobe, mit unterschiedlichen Farbstoffen zu markieren, und diese gleichzeitig mit dem Array zu hybridisieren (vergleichende Hybridisierung), wobei die von der zu untersuchenden Probe generierten Signale mit denen der Standardprobe verglichen werden und somit jedes Array-Element eine interne Eichung erfährt. Auf diese Weise ist allerdings nur eine Normierung von zwei jeweils selbst nicht standardisierten Meßwerten gegeneinander gewährleistet.

Bei allen auf dem Kopieren des Targets basierenden Markierungsverfahren wirkt sich nachteilig aus, daß die einzelnen Target-Sequenzen mit unterschiedlicher Effizienz kopiert

werden und im Extremfall, z.B. durch Ausbildung stabiler Sekundärstrukturen, für bestimmte Targets ein Informationsverlust auftreten kann. Außerdem entstehen auch hier wie bei den vorstehend genannten chemischen Methoden intern markierte Kopien des Targets mit den beschriebenen Nachteilen.

Dieses Problem kann umgangen werden, indem die Markierung außerhalb der zu detektierenden Region, beispielsweise am Terminus des nachzuweisenden Moleküls erfolgt. Zu diesem Zweck wurden Template-unabhängige Polymerasen wie die Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase oder die Poly(A)-Polymerase verwendet, die sukzessive Basen mit dem 3'-Terminus von DNA bzw. RNA verknüpfen (G. Martin, W. Keller, Tailing and 3' end labeling of RNA with yeast poly(A) polymerase and various nucleotides. RNA 1998, 4, 226-230, V. Rosenmeyer, A. Laubrock, R. Seibl, Nonradioactive 3' end labeling of RNA molecules of different length by Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. Analytical Biochemistry 1995, 224, 446-449, D. Figeys, A. Renborg, N. J. Dovichi, Labeling of double stranded DNA by ROX-dideoxycytosine triphosphate using Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and separation by capillary electrophoresis. Anal. Chem. 1994, 66, 4382-4383).


Ein genereller Nachteil des enzymatischen Einbaus von Basen, die mit Fluorophoren oder Ankermolekülen modifiziert sind, ist, daß diese in der Regel schlechte Substrate für Polymerasen darstellen und dadurch ineffizient inkorporiert werden. Diese Situation ist bei den vorstehend genannten Template-unabhängigen Polymerasen besonders ausgeprägt, so daß die gewünschte hohe spezifische Markierung auf diesem Weg nicht erreicht wird. Eine effiziente Markierung ist überhaupt nur mit ausgewählten Kombinationen aus Polymerase und markierter Base zu erzielen.

Weitere Einschränkungen ergeben sich aus der Detektionstechnik. Die gegenwärtig sensitivsten Fluoreszenz-Reader nutzen für die Anregung des Fluorophors die engen spektralen Linien von Laserquellen, so daß für eine sensitive Detektion nur Farbstoffe

verwendet werden können, die von verfügbaren Lasern anregbar sind. Ein Nachteil der Fluoreszenz-basierten Detektion auf Sonden-Arrays besteht in der im Vergleich zur radioaktiven Markierung etwa 100-fach geringeren Sensitivität (F. Bertucci et al., Sensitivity issues in DNA-array based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. Human Molecular Genetics 1999, 8 (9), 1715 – 1722). Die Detektion eines Targets ist daher häufig erst nach dessen Amplifikation bzw. nach Signalamplifikation möglich. Die US-Patentschrift 4,683,202 offenbart eine Amplifikation durch PCR für qualitative Nachweise. Quantitative Assays auf Sonden-Arrays erfordern ein Verfahren mit linearer Amplifikationskinetik. Ein solches Verfahren ist von J. Phillips, J. H. Eberwine (Antisense RNA amplification: A linear amplification method for analyzing the mRNA population from single living cell. Methods 1996, 10 (3), 283-288) sowie von Wang et al., (High fidelity mRNA amplification for gene profiling., Nat. Biotechnol. 2000, 18 (4), 457 – 459) beschrieben worden.

Neben diesen Fluoreszenz-basierten Verfahren sind Methoden zur Markierung des Targets bekannt, die einen auf anderen Effekten beruhenden Nachweis der Targets gestatten.: Speziell bei der Benutzung von Arrays mit großer Ausdehnung wird das Target häufig radioaktiv markiert. Die Wechselwirkung wird durch Inkubation mit einem Röntgenfilm oder einem Phosphorimager nachgewiesen. Des weiteren kann das Target mit einem Farbstoff markiert und dessen Anwesenheit mit Hilfe eines Photometers nachgewiesen werden. In DE 19543232 ist die Markierung des Target mit Detektionskügelchen beschrieben, deren Anwesenheit nach Wechselwirkung des Targets mit dem Sonden optisch nachgewiesen wird.


In DE 10033334 ist ein Verfahren offenbart, bei dem die Wechselwirkung von Targets mit spezifischen Sonden auf Sonden-Arrays über eine Reaktion sichtbar gemacht werden kann, bei der am Ort der Wechselwirkung ein unlösliches Produkt entsteht und abgelagert wird. Das Verfahren implementiert eine Signalamplifikation und zeichnet sich durch einen äußerst einfachen Detektoraufbau aus.



In Nature Biotechnology 1998, 16, 725-727 wird der Nachweis des Komplexes aus Target und Sonde durch Massenspektrometrie beschrieben. Ferner werden massensensitive Verfahren wie Oberflächenplasmonresonanz eingesetzt (J. M. Brockman et al., A multistep chemical modification procedure to create DNA Arrays on gold surfaces for the study of protein-DNA Interactions with surface plasmon resonance imaging, J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 8044-8051). Die US-Patentschrift 5,605,662 offenbart ein Verfahren zum direkten elektrischen Nachweis der Wechselwirkung.

Die auf einer Markierung des Targets beruhenden Nachweisverfahren weisen die gemeinsamen Nachteile auf, daß sie nicht standardisierbar sind und die Einführung einer Markierung aufwendig ist.

Ferner sind Verfahren zum Nachweis von molekularen Wechselwirkungen bekannt, bei denen auf eine direkte Markierung der Target-Nukleinsäure verzichtet werden kann.



In WO 92/01813 ist ein Verfahren offenbart, nach dem mit einer linearen Kinetik eine Vielzahl von Kopien eines zirkulären einzelsträngigen Templates hergestellt werden kann. In WO 2000/04193 wird der Einsatz dieses als RCA (Rolling Circle Amplification) bezeichneten Mechanismus zur Detektion molekularer Interaktionen auf Sonden-Arrays beschrieben. Nach spezifischer Wechselwirkung zwischen der am 3'-Ende auf dem Array immobilisierten Sonde und dem Target wird ein Adapter-Oligonukleotid mit dem Target hybridisiert. Dieses setzt sich aus einer zum Target komplementären Sequenz und einer Sequenz zusammen, die Komplementarität zu einem zirkulären einzelsträngigen DNA-Molekül aufweist. Die beiden Module sind über eine 5'-5'-Bindung miteinander verknüpft. Nach Zugabe des zirkulären einzelsträngigen DNA-Moleküls, einer Polymerase und der entsprechenden teilweise markierten Bausteine erfolgt an den Sonden, an denen eine Wechselwirkung stattgefunden hat, DNA-Synthese nach dem RCA-Mechanismus, wobei

durch den Einbau einer Vielzahl markierter Bausteine eine Markierung und Signalamplifikation erfolgt. Dieses Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und aufgrund der zweifachen spezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Target sowie zwischen Target und Adapter-Oligonukleotid durch eine hohe Spezifität aus. Es ist jedoch sehr aufwendig und nicht dazu geeignet, eine Vielzahl unterschiedlicher Wechselwirkungen auf einem Sonden-Array parallel zu detektieren.

Bei der als Sandwich-Hybridisierung bezeichneten Technik werden zwei Sonden verwendet, die an unterschiedliche, nicht überlappende Regionen der Target-Nukleinsäure binden (A.R. Dunn, J.A. Hassel, A novel method to map transcripts: evidence for homology between an adenovirus mRNA and discrete multiple regions of the viral genome. Cell 1977, 12, 23 – 36; M. Ranki et al., Sandwich hybridization as a convenient method for the detection of nucleic acids in crude samples. Gene 1983, 21 (1 - 2), 77 – 85). Eine der beiden Sonden wirkt als sogenannte Fang-Sonde (capture probe), mit deren Hilfe die Target-Nukleinsäure spezifisch an eine Oberfläche gebunden werden kann. Die zweite targetspezifische Sonde trägt eine detektierbare Einheit, so daß die Target-Nukleinsäure durch Hybridisierung an diese zweite Sonde markiert wird. Derartige Sandwich-Hybridisierungen erfüllen demnach zwei Funktionen, nämlich die Erhöhung der Spezifität des Nachweises durch doppelte Wechselwirkung mit zwei spezifischen Sonden und die Markierung hybridisierter Target-Nukleinsäuren durch Hybridisierung mit der Detektionssonde.

Eine Übersicht über Abwandlungen der Sandwich-Hybridisierungs-Methode ist in F. Lottspeich und H. Zorbas (Hrsg.), Bioanalytik, Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, 1998, angegeben. In US 4,486,539 ist die Anwendung von Sandwich-Hybridisierungen zum Nachweis von mikrobiellen Nukleinsäuren beschrieben. In US 5,288,609 ist eine Sandwich-Methode offenbart, welche die Immobilisierung, Hybridisierung und den Nachweis der Target-Nukleinsäure in einem Schritt zuläßt. In US 5,354,657 ist ein Sandwich-Hybridisierungsverfahren beschrieben, bei dem die Detektion auf der Wechselwirkung von

Digoxin bzw. Digoxigenin mit spezifischen detektierbaren Antikörpern beruht. In US 4,751,177 wird ein auf Sandwich-Hybridisierung basierendes Verfahren offenbart, bei dem eine bispezifische Fang-Sonde eingesetzt wird, deren eine Spezifität zur Hybridisierung mit der Target-DNA und deren andere Spezifität zur Hybridisierung mit einer Oberfläche dient. In EP 0 198 662 und EP 0 192 168 sind auf Sandwich-Hybridisierung basierende Verfahren beschrieben, bei denen der Immobilisierung des entstehenden Komplexes eine Hybridisierung von Fang- und Detektionssonde mit der Target-Nukleinsäure in Lösung vorgeschaltet ist.

In US 5,641,630 ist ein Verfahren offenbart, bei dem zunächst ein Komplex aus Target- und Fangsonde gebildet wird, welcher anschließend immobilisiert und danach durch Hybridisierung mit der Detektionssonde nachgewiesen wird. In US 5,695,926 ist ein Verfahren beschrieben, bei dem die Fang-Sonden eine Länge von 11 bis 19 Basen aufweisen und nicht kovalent auf einem hydrophoben Substrat immobilisiert sind. Aus US 4,882,269 ist ein auf Sandwich-Hybridisierung basierendes Verfahren bekannt, das eine Signalamplifikation gewährleistet.

Die vorstehend genannten Verfahren durch Sandwich-Hybridisierung besitzen den gemeinsamen Nachteil, daß für die Detektion jedes einzelnen Targets sowohl eine spezifische Fang-Sonde als auch eine spezifische Detektionssonde notwendig ist. Für den parallelen Nachweis einer Anzahl verschiedener Targets beispielsweise auf Sonden-Arrays ist eine ebenso große Anzahl spezifischer Detektionssonden notwendig, wodurch die vorstehend genannten Verfahren nur bis zu einem niedrigen Parallelisierungsgrad einsetzbar sind.

Um dieses Problem zu lösen, wurden im Stand der Technik Verfahren beschrieben, bei denen alle Targets eines Target-Gemisches mit einer einheitlichen Adapter-Sequenz versehen werden, indem das Targetgemisch ausgehend von einem Primer kopiert wird, der an seinem 5'-Ende die Adaptersequenz enthält. Das homogene und effiziente Einführen der

Adaptersequenz über einen Adapter-Primer ist jedoch bei solchen Targets nachteilig, die nicht über gleiche Sequenzmodule verfügen, an die der Primer binden kann, so daß dieses Verfahren nur einen begrenzten Anwendungsbereich hat.

Eine sensitive, die Einführung einer einheitlichen Adaptersequenz erfordernde Sandwich-Hybridisierungs-Methode zum sensitiven Nachweis von Wechselwirkungen auf Sonden-Arrays basiert auf der Verwendung von vielfach markierten Dendrimern (siehe US 5,487,973, US 5,484,904, US 5,175,270, kommerziell erhältlich von Genisphere Inc., Montvale, NJ, USA). Bei diesem Verfahren werden mit einer Adaptersequenz versehene Kopien des Targets mit einem Sonden-Array inkubiert, wobei eine spezifische Hybridisierung stattfindet. Der Nachweis der spezifischen Hybridisierung erfolgt in einem zweiten Schritt durch Hybridisierung eines vielfach markierten Dendrimers, welches das Komplement der Adaptersequenz trägt und so an die Adaptersequenz bindet. Aufgrund der Beschränkungen bei der Einführung der Adaptersequenz über einen Adapterprimer ist auch die Anwendbarkeit dieses Verfahrens auf Targets mit einheitlichen Sequenzmodulen wie beispielsweise auf polyadenylierte eukaryontische RNA begrenzt.

Die vorstehend beschriebenen Nachweisverfahren, bei denen auf eine direkte Markierung des Targets verzichtet wird, besitzen den gemeinsamen Nachteil, daß sie, wenn überhaupt, nur begrenzt parallelisierbar und damit nicht für Array-basierte Nachweisverfahren geeignet sind. Sollte die Parallelisierbarkeit dieser Methoden gewährleistet werden, wäre dies wiederum mit einer Modifikation oder dem Kopieren der Targets verbunden und somit aufwendig und nicht standardisierbar.

Bislang sind keine Verfahren bekannt, mit denen eine Vielzahl unterschiedlicher Wechselwirkungen zwischen Targets und Sonden auf einem Sonden-Array effizient, d.h. insbesondere mit hoher Sensitivität und Spezifität; homogen, d.h. mit gleicher Effizienz für unterschiedliche Targets; und parallel detektiert werden können.

Es besteht daher ein starkes Bedürfnis nach weiteren Verfahren zum Nachweis von Targets mittels Sonden-Arrays, welche die Nachteile des Stands der Technik nicht aufweisen.

Ein vielversprechender Ansatz besteht darin, auf die mit den vorstehend beschriebenen Problemen verbundene Markierung der Targets zu verzichten. Derartige Verfahren basieren demnach auf der Markierung der Sonden und dem selektiven Entfernen von Sonden nach der Wechselwirkung mit den Targets.

In WO 98/01533 ist ein derartiges Sonden-Array offenbart, bei dem auf der Oberfläche eines festen Trägers eine Vielzahl von spaltbaren Signalelementen immobilisiert ist. Die Signalelemente umfassen einen chemischen Linker mit einer potentiellen Bruchstelle, insbesondere einer Siloxan-Gruppe, wobei an dem Linker entgegengesetzt zur Stelle der Immobilisierung auf einer Oberfläche eine Markierung angebracht ist. Die Targetspezifität wird durch zwei Oligonukleotidsonden vermittelt, die unterhalb bzw. oberhalb der Siloxan-Bruchstelle mit dem chemischen Linker verknüpft sind. Durch die Bindung des Targets sowohl an die erste als auch an die zweite Oligonukleotidsonde eines spaltbaren Signalelements bleibt die Markierung trotz einer nachfolgenden Spaltung der Siloxan-Bruchstelle mit der Substratoberfläche verknüpft. Durch die Gegenwart oder Abwesenheit von Signalen nach dem Kontakt mit der Probe und dem Kontakt mit einem die Bruchstelle spaltenden Agens wird die Gegenwart oder Abwesenheit von Target angezeigt.

Die Synthese der in WO 98/01533 beschriebenen Signalelemente ist jedoch äußerst aufwendig, so daß eine effiziente und homogene Markierung des Sonden-Arrays vor der Wechselwirkung mit den Targets nicht gewährleistet ist. Ferner besteht bei dem in WO 98/01533 beschriebenen Verfahren die Möglichkeit, daß die zwei Sondensequenzen eines Signalelements nicht wie vorstehend beschrieben gemeinsam mit einem Targetmolekül wechselwirken, sondern daß an jede der beiden Sonden jeweils ein Targetmolekül

hybridisiert. In letzterem Fall wird nach der Spaltung der Siloxan-Bruchstelle die Markierung von der Substratoberfläche abgelöst und ein fälschlicherweise negatives Meßergebnis erhalten.

In US 4,876,187 sind Sonden zum Nachweis von Targets beschrieben, die eine Markierung, eine spaltbare Bindung und einen Immobilisierungsanker aufweisen. Der ebenfalls dort beschriebene Assay unter Verwendung derartiger Sonden durchgeführt umfaßt die Schritte Immobilisierung, Hybridisierung, enzymatisches Schneiden der spaltbaren Bindung sowie Detektion von verbliebenen mit der Oberfläche gekoppelten Markern.


Ein an einer Reihe von Sonden parallel durchführbarer Nachweis ist in US 4,876,187 nicht beschrieben. Insbesondere sind die dort beschriebenen Sonden für Array-Verfahren nicht geeignet, da eine enzymatische Spaltung von auf einer Oberfläche immobilisierten Sonden aufgrund der räumlichen Nähe der Spaltstelle zur Oberfläche äußerst ineffizient ist, wodurch ein hoher Hintergrund durch fälschlicherweise positive Signale erzeugt werden würde. Ferner ist die in US 4,876,187 beschriebene Methode der kovalenten Immobilisierung auf der Oberfläche nicht spezifisch für die dafür vorgesehenen reaktiven Gruppen, so daß die Immobilisierung auch an anderen Gruppen innerhalb der Sonde erfolgt. Falls sich die Immobilisierungsstelle zwischen der Spaltstelle und der Markierung befindet, verbleibt die Markierung auch nach der Spaltung an der Oberfläche. Somit ist eine quantitative Entfernung der Markierung von Sonden, an die keine Targets hybridisiert haben, von der Oberfläche nicht möglich, wodurch wiederum ein hoher Hintergrund erzeugt wird. Eine ebenfalls in US 4,876,187 beschriebene nicht kovalente Immobilisierung hat sich als nicht stabil erwiesen, so daß bereits ohne Schneiden Sonden in die Lösung entlassen werden und eventuell fälschlicherweise negative Meßergebnisse geliefert werden. Das in US 4,876,187 beschriebene Verfahren hat folglich aufgrund der damit vorstehend genannten Probleme keine praktische Bedeutung.

Die in US 4,775,619 und US 5,118,605 beschriebenen Verfahren umgehen die vorstehend beschriebene Problematik des hohen Hintergrundes durch Durchführung eines sogenannten inversen Assays. Dabei führt die Hybridisierung eines Targets mit einer immobilisierten und markierten Sonde zur Bildung einer labilen Bindung zwischen Oberfläche und Markierung, wie beispielsweise einer Restriktase-Schnittstelle oder einer chemisch labilen Einzelstrangregion. Die Spaltung dieser labilen Bindung führt zum Ablösen der Markierung, welche dann in der Lösung quantifiziert wird. Eine derartige Vorgehensweise ist für Array-Verfahren nicht praktikabel, da eine räumliche Auflösung nicht mehr gewährleistet ist, wenn die Detektion nicht über auf einer Oberfläche immobilisierte Markierungen erfolgt.

Die Übertragung der in US 4,775,619 und US 5,118,605 beschriebenen Methode auf Array-Anwendungen durch eine Aufnahme des Arrays vor der Wechselwirkung mit den Targets und nach dem Entfernen der Markierungen, womit eine Wechselwirkung für solche Sonden festgestellt wird, an denen nach der Inkubation mit Targets und dem Spalten der labilen Bindung kein Signal detektierbar ist, ist ebenfalls nicht möglich, da die Sondenkonzentrationen üblicherweise wesentlich höher sind als die Konzentrationen der nachzuweisenden Targets und somit auch auf Array-Elementen, an denen einige der Markierungen aufgrund der Hybridisierung der Sonden mit den Targets abgespalten wurden, ein starkes Signal detektiert wird. Ein spezifischer Nachweis insbesondere von Targetmolekülen in geringer Konzentration ist auf diese Weise nicht möglich.


In US 5,367,066, US 5,552,538 und US 5,578,717 ist die Struktur und Synthese von Oligonukleotiden mit chemisch oder physikalisch spaltbaren Bindungen zum Einsatz bei Hybridisierungsassays, beispielsweise in den in US 4,775,619 und US 5,118,605 beschriebenen Assays, offenbart. Die Spaltbarkeit der Oligonukleotidsonden wird teilweise durch Einführen sperriger Seitengruppen erreicht, die jedoch das Hybridisierungsverhalten der Sequenzen nachteilig beeinflussen. Des weiteren ist die Synthese der dort beschriebenen Oligonukleotidbausteine kompliziert und insbesondere nicht direkt in die Standard-DNA-

Synthesechemie zum Aufbau der Oligonukleotidsonden zu integrieren. Schließlich ist die Handhabbarkeit der Verbindungen aufgrund ihrer teilweisen Lichtempfindlichkeit stark eingeschränkt. Bekanntermaßen ist die Effizienz photochemischer Spaltungen nicht quantitativ.



Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein einfaches Verfahren zum Nachweis von molekularen Targets mit Hilfe von Sonden-Arrays zur Verfügung zu stellen, bei dem auf eine Markierung der Targets verzichtet werden kann und das die vorstehend beschriebenen Nachteile der Verfahren des Stands der Technik überwindet.


Des weiteren ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung Sonden-Arrays bereitzustellen, bei denen die Markierung durch Spaltung einer labilen Bindung effizient und selektiv von solchen Sonden entfernt werden kann, an denen keine spezifischen Wechselwirkungen mit Targets stattgefunden haben, insbesondere auch dann, wenn die Sonden auf einer Oberfläche immobilisiert sind.



Ferner ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung Sonden-Arrays bereitzustellen, bei denen die labilen Bindungen in den Sonden derart beschaffen sind, daß sie die Spezifität der Wechselwirkung zwischen Sonden und Targets nicht oder nur gering beeinflussen.


Ein weiteres Problem der im Stand der Technik beschriebenen Array-Experimente ist, daß der mit ihnen erreichte Standardisierungsgrad unbefriedigend ist. Beispielsweise sind in der Regel von unterschiedlichen Laboratorien durchgeführte Experimente nicht miteinander vergleichbar, so daß deren Daten nicht gesammelt und in gemeinsamen Analyse unterzogen werden können. Selbst die Vergleichbarkeit von Experimenten, die in einem Labor mit unterschiedlichen Arrays des gleichen Layouts bzw. unterschiedlichen, aber gleich aufgearbeiteten Proben ausgeführt wurden, ist nur bedingt gegeben (siehe z.B. Schuchhardt, J.; Beule, D.; Malik, A.; Wolski, E.; Eickhoff, H.L.; Herzel, H., Nucleic Acids Research,

2000, Vol. 28, No. 1, E47; Draghici, S.; Kuklin, A.; Hoff, B.; Shams, S. Drug Discovery & Development 2001, Vol. 4, No.3, 332; Zien A., Aigner T., Zimmer R., Lengauer T., Bioinformatics 2001 Jun;17:S323-S331; Tseng G.C., Oh M.K., Rohlin L., Liao J.C., Wong W.H. Nucleic Acids Res 2001 Jun 15;29(12):2549-2557, Lockhart D.J., Winzler E.A., Nature 2000 Jun 15;405(6788):827-836).




Eine Ursache für die schlechte Standardisierbarkeit der Array-basierten Nachweisverfahren des Stands der Technik ist die schwankende Qualität der hergestellten Arrays. Insbesondere ist es in der Regel nicht möglich, die Qualität der hergestellten Arrays vor Durchführung des Experiments zu ermitteln und in die anschließende Auswertung mit einzubeziehen. Dies führt zwangsläufig zu erheblichen Fehlern.

Eine zweite Fehlerquelle für die Standardisierung von Meßergebnissen aus Array-Experimenten entsteht, falls das Nachweisverfahren auf der Markierung von Targets beruht. Unabhängig von der Methode ist die Targetmarkierung ein schlecht standardisierbarer Prozeß, der allein schon aufgrund der nicht erfaßbaren Schwankungen in der Qualität des Ausgangsmaterials mit ganz unterschiedlicher Effizienz abläuft und zusätzlich von der Qualität von Enzymen, Monomeren, markierten Bausteinen u.a. beeinflusst wird.




Im folgenden werden Ansätze beschrieben, mit denen Arrayexperimente zumindest teilweise normiert werden können. In US 5,800,992 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem zwei unterschiedlich markierte Proben gegen ein und dasselbe Array hybridisiert werden. Eine Probe dient dabei als Referenz. Das Verfahren normiert dadurch gegen Schwankungen in der Spot-Qualität. In Bezug auf die unterschiedliche Markierungseffizienz wird allerdings nur bedingt eine Normierung erreicht, da man lediglich eine nicht klar definierte Probe, die zu untersuchende Probe, gegen eine andere nicht klar definierte Probe, die Referenz, normiert. Als weiterer Nachteil ergibt sich, daß die unterschiedliche Markierung beider Proben eine unterschiedliche Effizienz des Einbaus der Farbstoffe, eine unterschiedliche Quantenausbeute,

Quenching und eine unterschiedliche Abhängigkeit zwischen Fluoreszenz und Konzentration zur Folge hat. Diese Unterschiede in den biochemischen und physikalischen Eigenschaften stellen weitere Fehlerquellen bei der Normierung dar.



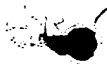
Ein weiterer Ansatz wird in Selinger D.W., Cheung K.J., Mei R., Johansson E.M., Richmond C.S., Blattner F.R., Lockhart D.J., Church G.M., Nat. Biotechnol. 2000 Dec; 18(12):1262-8 beschrieben. Hier wird versucht, sowohl gegen Schwankungen der Spot-Qualität als auch gegen Schwankungen in der Qualität der Markierung des Targets zu normalisieren. Eine Normalisierung gegen die unterschiedliche Markierungseffizienz wird erreicht, indem der Probe extern erzeugte Targets abgestufter bekannter Konzentration, sog. Spiking-Targets, in einem bestimmten Mengenverhältnis zugegeben werden. Auf dem Array werden zusätzlich gegen diese Spiking-Targets gerichtete Oligonukleotide angeordnet, deren Intensität nach erfolgter Hybridisierung zur Chip zu Chip-Normierung eingesetzt werden können. Der Nachteil dieser Vorgehensweise besteht darin, daß bestimmte Einschränkungen der Probenqualität, die die Markierungseffizienz senken, wie beispielsweise eine Fragmentierung der Nukleinsäure oder eine Komplexbildung mit Proteinen, nicht mit den Spiking-Sonden erfaßt werden.



Eine Normalisierung gegen Schwankungen der Spot-Qualität soll bei Selinger et al. dadurch erreicht werden, daß mit einem bestimmten Oligonukleotid bestückte Spots, sog. Eichspots, über das gesamte Array verteilt werden. Ein dazu komplementäres Oligonukleotid wird dem Sample zugegeben. Die Intensität der Eichspots wird gemessen und die Abweichung eines jeden Eichspots von der durchschnittlichen Eichspotintensität wird verwendet, um einen Faktor zu ermitteln, der bei der Berechnung der Ergebnisse aller anderen Spots miteinbezogen wird. In den auf jeden Spot anzuwendenden Faktor geht zusätzlich die Entfernung zum Eichspot ein. Diese Vorgehensweise ist äußerst kompliziert und hat den Nachteil, daß nur globale Schwankungen der Spotqualität über die Fläche erfaßt werden. Qualitätsprobleme, die


nur einzelne Spots betreffen und keine Auswirkungen auf die Qualität der Nachbarspots besitzen, können mit dieser Methode nicht erfaßt werden.

Gegenwärtig ist somit kein Verfahren verfügbar, das sowohl die mit der Markierung der Targetmoleküle verbundenen Fehler vermeidet als auch das Einbeziehen der Arrayqualität auf Spotebene in die Auswertung von Arrayexperimenten gestattet.



Deswegen besteht eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung in der Bereitstellung von Sonden-Arrays, deren Aufbau eine standardisierte qualitative und gegebenenfalls quantitative Auswertung der Array-Experimente gestattet, die die bislang bekannten Möglichkeiten übertrifft.


Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Herstellung von Sonden-Arrays bereitzustellen, das eine effiziente, homogene und/oder parallele Synthese der Sonden gewährleistet und insbesondere möglichst nicht durch den Einbau von labilen Bindungen in die Sondenmoleküle beeinflusst wird.




Bei der Herstellung von Sonden-Arrays werden derzeit zwei prinzipiell unterschiedliche Verfahren angewendet. Bei einer Methode werden separat synthetisierte Sonden, beispielsweise Oligonukleotide, mit Hilfe von Automaten, sogenannten Spottern, die das ortsspezifische Ablegen kleinster Flüssigkeitsmengen gewährleisten, auf Oberflächen aufgebracht und kovalent oder nicht kovalent mit dieser verknüpft. Das Verfahren arbeitet seriell. Jeder Spot wird individuell mit der Sonde bestückt. Die Qualität der einzelnen Spots ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, die im Verlauf des seriellen Fertigungsprozesses variieren, so daß sich die einzelnen Spots sich in ihren Eigenschaften in nicht voraussagbarer Weise unterscheiden.

Alternativ werden DNA-Arrays durch ortsspezifische in situ-Synthese der Sonden, beispielsweise der Oligonukleotidsonden erzeugt. Die Synthese erfolgt parallel,

beispielsweise im Wafermaßstab. Das Monitoring der Syntheseeffizienz an jedem einzelnen Array-Element gestaltet sich bei diesem hochparallelen, häufig im Wafermaßstab ausgeführten Verfahren als schwierig. Klassische Monitoring-Ansätze wie beispielsweise Trityl-Monitoring erweisen sich als untauglich, da sie nur ein summarisches Bild der Kopplungseffizienz über den gesamten Wafer abgeben.



Bei beiden vorstehend beschriebenen Herstellungsverfahren kann eine Aussage zur Qualität der erzeugten Arrays erst nach deren Fertigstellung erfolgen. Dazu werden beispielsweise zumindest stichprobenartig Chips einer Charge mit einer Standardprobe hybridisiert und die Chipqualität anhand der Hybridisierungssignale ermittelt. Nachteilig an diesem Verfahren ist, daß bei stichprobenartiger Hybridisierung keine sichere Aussage zur Qualität jedes einzelnen Chips gemacht werden können: Würde mit jedem einzelnen Chip eine Probehybridisierung durchgeführt werden, müßten deren Signale nach Auswertung durch ein geeignetes Verfahren wieder beseitigt werden.



Einen alternativen Ansatz zur Qualitätskontrolle von Arrays, die durch Synthese erzeugt wurden, wurde von M. Beier und J.D. Hoheisel, Nucleic Acids Res. 2000, Vol. 28, No.4 beschrieben. Gemäß dieser Veröffentlichung wird im Anschluß an die Synthese der Oligonukleotide auf der Arrayoberfläche ein Farbstoff über einen labilen Linker gekoppelt. Die an den einzelnen Spots ermittelte Signalintensität ist ein Maß für die Syntheseausbeute. Nachteil dieses Verfahrens ist, daß die Markierung vor dem Hybridisierungsassay entfernt werden muß und nicht gleichzeitig zur Detektion von Hybridisierungsereignissen verwendet werden kann.

Deshalb besteht eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem die Qualität jedes einzelnen Arrays ohne die Notwendigkeit weiterer Verfahrensschritte wie Probehybridisierungen sofort nach dessen Herstellung untersucht werden kann.

Diese und weitere Aufgaben der vorliegenden Erfindung werden durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft Sonden-Arrays, mit denen unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen Sonden- und Targetmolekülen auf Sonden-Arrays hochspezifisch, hochsensitiv und quantitativ nachgewiesen werden können.

Die auf dem erfindungsgemäßen Sonden-Array angeordneten Sondenmoleküle, die dem Nachweis der molekularen Wechselwirkungen mit den Targetmolekülen dienen, umfassen mindestens eine Markierung, d.h. eine detektierbare Einheit, oder eine Ankergruppe, an die eine detektierbare Einheit gekoppelt werden kann, sowie mindestens eine Sollbruchstelle, d.h. eine labile bzw. selektiv spaltbare Bindung, die spezifisch destabilisiert bzw. gespalten werden kann.

Die Markierung, mit der Sonden im Verlauf ihrer Herstellung bzw. im Verlauf der Herstellung des Sonden-Arrays verknüpft worden sind, kann vorzugsweise in jeder Phase der Verwendung des Arrays detektiert werden, d.h. auch vor der Inkubation des Arrays mit der zu untersuchenden Probe, und erlaubt dadurch unter anderem eine Einschätzung der Qualität der hergestellten Arrays, indem die Belegungsdichte jedes einzelnen Array-Elemente nach der Array-Herstellung und vor ihrer Verwendung zum Nachweis von Targetmolekülen ermittelt werden kann. Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Sonden-Arrays ist, daß die für die Qualitätskontrolle verwendeten Signale vor dem eigentlichen Array-Experiment nicht beseitigt werden müssen, sondern vielmehr die Basis für die Detektion spezifischer Wechselwirkungen bilden.

Die zwischen der Markierung und der Position der Verknüpfung der Sonden mit der Array-Oberfläche angeordnete selektiv spaltbare Bindung ermöglicht, daß die für die

Qualitätskontrolle verwendete Markierung bzw. detektierbare Einheit auch zum spezifischen Nachweis der molekularen Wechselwirkung zwischen Sonden und Targets eingesetzt werden kann. Dabei ist die Sollbruchstelle bzw. selektiv spaltbare Bindung innerhalb des Sondenmoleküls so positioniert, daß ein Bruch der Bindung zum Ablösen der detektierbaren Einheit bzw. der Ankergruppe mit der detektierbaren Einheit von der Array-Oberfläche führt. Dagegen bleiben solche Markierungen mit der Array-Oberfläche verknüpft, deren Sondenmoleküle spezifisch mit Targetmolekülen wechselgewirkt haben, da das mit der Markierung verknüpfte Spaltprodukt der Sonde bzw. Sondenfragment über die Wechselwirkung mit dem Target mit dem zweiten Spaltprodukt der Sonde, das auf der Oberfläche des Arrays immobilisiert ist, gekoppelt bleibt.

Die Sondenmoleküle des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays umfassen folglich eine selektiv spaltbare Bindung, die derart beschaffen ist, daß ihre Spaltung zu einem Ablösen der Markierung von Sondenmolekülen führt, an denen keine spezifischen Wechselwirkungen mit Targetmolekülen stattgefunden haben.

Der Aufbau des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays ermöglicht eine wesentliche Vereinfachung von Assays zum Nachweis von Targets in einer zu untersuchenden Probe. Der Nachweis der spezifischen Wechselwirkung zwischen Sonde und Target erfolgt über bereits bei der Herstellung der Sonden-Arrays angebrachte Markierungen. Damit kann auf eine Markierung der Targets, die in der Regel einen kosten- und arbeitsaufwendigen Prozeß darstellt und ferner häufig nicht ausreichend effizient und homogen ist, verzichtet werden.

Ferner wird durch das erfindungsgemäße Sonden-Array gewährleistet, daß die von der Markierung der Targetmoleküle und damit von den Targetmolekülen als solches abhängigen mehrstufigen Array-basierten Nachweisverfahren in einen homogenen, von den Target-Molekülen vollständig unabhängigen Array-basierten Assay überführt werden können.


Daraus ergibt sich eine deutliche Erweiterung des Einsatzbereiches von Array-basierten Analysen.

Über eine Normierung der Signale durch Verwendung von internen, insbesondere nicht abspaltbaren Kontrollmarkierungen können die erfindungsgemäßen Sonden-Arrays ferner auch für quantitative Assays eingesetzt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Begriffe und Definitionen verwendet:

Unter einer Sonde bzw. einem Sondenmolekül wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Molekül verstanden, das zum Nachweis anderer Moleküle durch ein bestimmtes, charakteristisches Bindungsverhalten bzw. eine bestimmte Reaktivität verwendet wird. Für die auf dem Array angeordneten Sonden mit selektiv spaltbarer Bindung kommt jede Art von Molekülen in Frage, die sich an feste Oberflächen koppeln lassen und eine spezifische Affinität aufweisen. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um Biopolymere aus den Klassen der Peptide, Proteine, Nukleinsäuren und/oder deren Analoga. Besonders bevorzugt sind die spaltbaren Sonden Nukleinsäuren und/oder Nukleinsäureanaloga. Als Nukleinsäuren können sowohl DNA- als auch RNA-Moleküle verwendet werden.


Unter einem Target bzw. einem Targetmolekül wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung das mit einer molekularen Sonde nachzuweisende Molekül verstanden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den zu detektierenden Targets um Nukleinsäuren. Der erfindungsgemäße Sonden-Array kann jedoch analog zum Nachweis von Protein/Sonden-Wechselwirkungen, Antikörper/Sonden-Wechselwirkungen, usw. eingesetzt werden.



Unter einer selektiv spaltbaren Bindung wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Bindung verstanden, die sich von anderen im Sondenmolekül vorliegenden Bindungen derart unterscheidet, daß sie unter bestimmten Bedingung spezifisch gespalten werden kann, ohne daß die anderen Bindungen, insbesondere die Bindungen des Rückgrats der Sondenmoleküle beeinträchtigt werden. Beispielsweise kann bei der Verwendung von Nukleinsäuren als Sonden eine selektiv spaltbare Bindung gespalten werden, ohne die Phosphodiesterbindungen der Sonde zu spalten. Die selektiv spaltbare Bindung wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch als labile Bindung oder Sollbruchstelle bezeichnet.

Unter einem Sample bzw. einer Probe wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein komplexes Gemisch verstanden, das eine Vielzahl von Targets enthält.

Eine Markierung bezeichnet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine detektierbare Einheit, beispielsweise ein Fluorophor, oder eine Ankergruppe, an die eine detektierbare Einheit gekoppelt werden kann.



Unter einem Sonden-Array wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Anordnung von molekularen Sonden auf einer Oberfläche verstanden, wobei die Position einer jeden Sonde separat bestimmt ist.

Unter einem Array-Element wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein bestimmtes Areal auf einer Oberfläche verstanden, auf dem eine einheitliche Zusammensetzung von Sonden angeordnet ist, wobei die Summe aller belegten Array-Elemente das Sonden-Array ist.

Der erfindungsgemäße Sonden-Array zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von Targets aus einer Probe durch molekulare Wechselwirkungen zwischen Sondenmolekülen und Targetmolekülen auf dem Sonden-Array umfaßt eine Array-Oberfläche sowie an

definierten Stellen auf der Array-Oberfläche immobilisierte Sondenmoleküle. Wesentliche Merkmale des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays sind, daß die Sondenmoleküle mindestens eine Markierung aufweisen und innerhalb des Sondenmoleküls zwischen der Stelle ihrer Immobilisierung auf der Array-Oberfläche und der Markierung mindestens eine selektiv spaltbare Bindung aufweisen.


Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays sind die Sonden Oligonukleotide, die innerhalb ihrer Nukleotidsequenz eine selektiv spaltbare Bindung aufweisen. Beispielsweise kann es sich bei den Oligonukleotidsonden um Oligonukleotide mit einer Länge von 10 bis 100 Basen, vorzugsweise 15 bis 50 Basen und besonders bevorzugt von 20 bis 30 Basen Länge handeln, die auf der Array-Oberfläche immobilisiert sind.

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung eingesetzten selektiv spaltbaren Bindungen zeichnen sich dadurch aus, daß sie das Hybridisierungsverhalten der Sonden, insbesondere deren Spezifität und/oder Affinität für bestimmte Targetmoleküle, nicht oder nur gering beeinflussen. Des weiteren umfassen die Sondenmoleküle des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays vorzugsweise labile Bindungen, die unter Bedingungen gespalten werden können, die die Wechselwirkung zwischen Sonde und Target nicht negativ beeinflussen und/oder die nach der Spaltung keine Verknüpfung des markierten Sondenfragments mit der Array-Oberfläche verursachen.

Ferner sind die selektiv spaltbaren Bindungen vorzugsweise derart beschaffen, daß sie auch dann effektiv spaltbar sind, wenn die Sonden an der Array-Oberfläche immobilisiert sein.

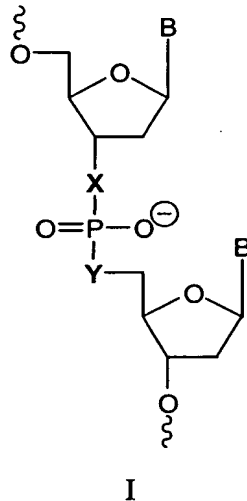
Die selektiv spaltbare Bindung des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays kann vorzugsweise durch chemische und/oder physikalische Methoden selektiv gespalten werden.

Eine effiziente Spaltung an der Oberfläche ist insbesondere durch Agenzien mit geringem Ausmaß wie Atome und Ionen gewährleistet. Vorzugsweise ist die labile Bindung deshalb durch einfache chemische Agenzien selektiv spaltbar, beispielsweise durch Zugabe von Ionen, besonders bevorzugt von Säureanionen, Basekationen, Fluorid- und/oder Schwermetallionen wie Quecksilber- und/oder Silberionen.

 Im Falle der Herstellung der Arrays durch Immobilisierung von separat synthetisierten Oligonukleotiden ist die selektiv spaltbare Bindung unter den Bedingungen, die bei der Immobilisierung der Sonden auf der Array-Oberfläche angewendet werden, stabil. Erfolgt die Herstellung der Sonden in situ durch ortsspezifische Synthese auf der Array-Oberfläche, ist es bevorzugt, daß die labile Bindung im Rahmen des Syntheseverlaufes effizient erzeugt werden kann. Besonders bevorzugt ist die Bereitstellung der labilen Bindung mittels Phosphoamiditchemie. Gleiches gilt im übrigen für den Einbau der detektierbaren Einheit.

Folglich ist es bevorzugt, daß die selektiv spaltbare Bindung in einer Nukleinsäure vorliegt, die durch herkömmliche DNA- oder RNA-Synthese hergestellt werden kann. Besonders bevorzugt umfassen die Sondenmoleküle des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays eine Nukleinsäure der Formel A_1-S-A_2 , wobei S eine Nukleinsäure bzw. ein Nukleotidbaustein ist, die mindestens eine selektiv spaltbare Bindung umfaßt, und A_1 und A_2 beliebige Nukleinsäuren oder Nukleinsäureanaloge sind. Über eine der beiden Nukleinsäuren oder Nukleinsäureanaloge A_1 und A_2 ist das Sondenmolekül auf der Oberfläche des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays immobilisiert, während die andere mindestens eine Markierung aufweist. S ist vorzugsweise ein Nukleotid-Dimer, das durch eine selektiv spaltbare Bindung verbrückt ist.

Beispiele für besonders bevorzugte DNA-Nukleotid-Bausteine S, die eine selektiv spaltbare Bindung umfassen, sind in der folgenden Formel I angegeben:



Dabei kann X und Y unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe vorzugsweise bestehend aus O, NH und S, wobei X und Y nicht gleichzeitig O sind.

B steht für eine Nucleobase wie die Purin-Derivate Adenin und Guanin sowie die Pyrimidine Cytosin und Thymin.

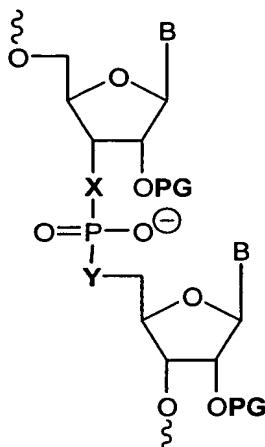
Die selektiv spaltbare Bindung innerhalb der Nukleotidsequenz derartiger Oligonukleotidsonden ist vorzugsweise eine Phosphothioatbindung oder eine Phosphoramidatbindung. Besonders bevorzugt ersetzt die Phosphothioatbindung, d.h. eine Zucker-O-P-S-Zucker-Bindung eine Phosphodiesterbindung, d.h. eine Zucker-O-P-O-Zucker-Bindung eines unmodifizierten Oligonukleotids. In dieser Ausführungsform sind zwei Nukleoside durch eine Phosphothioatbindung verbunden.

Alternativ kann die selektiv spaltbare Bindung innerhalb der Nukleotidsequenz auch eine andere Schwefel- oder Stickstoff-modifizierte Esterbindung wie beispielsweise eine Phosphonothioat-Bindung sein.

Weitere Beispiele für die Bereitstellung von selektiv spaltbaren Bindungen in den Sondenmolekülen des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays sind Amid-, 1,2-Diol-, Disulfid- und/oder Sulfonyl-Gruppen sowie weitere Gruppen, die in US 5,118,605 beschrieben sind und unter den dort genannten Bedingungen spaltbar sind. Diese Gruppen sind allerdings weniger bevorzugt, da u.a. ihre Inkorporation in Oligonukleotidsonden mittels herkömmlicher Nukleinsäure-Synthese nicht möglich ist.

Alternativ können auch physikalische Methoden zur Spaltung der selektiv spaltbaren Bindung in den Sondenmolekülen eingesetzt werden. So kann die selektiv spaltbare Bindung beispielsweise photolytisch selektiv gespalten werden. Nukleotidbausteine, die eine photolytisch selektiv spaltbare Bindung umfassen und für die Synthese der Sondenmoleküle des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays eingesetzt werden können, sind beispielsweise in US 5,367,066, US 5,552,538 und US 5,578,717 beschrieben.

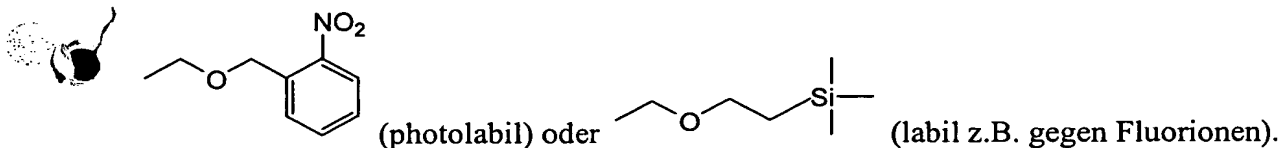
Weitere Beispiele für besonders bevorzugte RNA-Nukleotid-Bausteine, die eine chemisch oder physikalisch selektiv spaltbare Bindung umfassen, sind in der folgenden Formel II angegeben:



II

Dabei kann X und Y unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Gruppe vorzugsweise bestehend aus O, NH und S, wobei X und Y nicht gleichzeitig O sind, wenn PG keine labile Schutzgruppe ist.

PG wird vorzugsweise ausgewählt der Gruppe bestehend aus H und labilen Schutzgruppen wie



B steht in Formel II für eine Nucleobase wie die Purin-Derivate Adenin und Guanin sowie die Pyrimidine Cytosin und Uracil.

Bevorzugt sind allerdings Sondenmoleküle mit selektiv spaltbaren Bindungen, die unter normalen atmosphärischen, Temperatur-, und Licht-Bedingungen stabil sind.

Bei einer alternativen Ausführungsform ist die labile Bindung selektiv durch enzymatische Methoden spaltbar. Beispiele für Nukleotidbausteine, die derartige labile Bindungen umfassen, sind in US 4,775,619 und US 4,876,187 beschrieben. Enzymatische Methoden zur Spaltung der selektiv spaltbaren Bindung sind allerdings im Rahmen der vorliegenden Erfindung weniger bevorzugt, da enzymatische Aktivitäten durch die Nähe der selektiv spaltbaren Bindung zur Oberfläche aufgrund der Immobilisierung der Sondenmoleküle stark behindert werden. Folglich weist eine enzymatische Spaltungsreaktion nur eine sehr niedrige Effizienz auf, was einen unerwünschten hohen Signalhintergrund durch fälschlicherweise positive Meßergebnisse zur Folge hat. Somit kann bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays die selektiv spaltbare Bindung nicht durch enzymatische Methoden selektiv gespalten werden.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays befindet sich die selektiv spaltbare Bindung ungefähr in der Mitte zwischen der Stelle der Immobilisierung der Sonde auf der Array-Oberfläche und der Position der Markierung der Sonde. Somit wird gewährleistet, daß die Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung des Targets mit dem immobilisierten Sondenfragment, welches dem nach der Bindungsspaltung an der Oberfläche verbleibenden Rest der Sonde entspricht, wesentlich vermindert bzw.

nahezu ausgeschlossen ist. Befindet sich die selektiv spaltbare Bindung dagegen zu nahe an der Array-Oberfläche, so ist der Komplex aus Sonden- und Targetmolekül nach der Spaltung nicht mehr ausreichend stabilisiert, da die Hybridisierung des Targets mit dem an der Array-Oberfläche immobilisierten Sondenfragment nicht stabil genug ist. Dies würde zu fälschlicherweise negativen Meßergebnissen führen.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays kann die selektiv spaltbare Bindung quantitativ gespalten werden. Somit wird gewährleistet, daß die Markierungen von denjenigen Sonden vollständig entfernt werden, an denen keine Wechselwirkung mit den nachzuweisenden Targets stattgefunden hat. Dagegen bleiben solche Markierungen mit der Array-Oberfläche verknüpft, deren Sonden spezifisch mit Targets wechselgewirkt haben, da das mit der Markierung verknüpfte Spaltprodukt der Sonde über die Wechselwirkung mit dem Target mit dem zweiten Spaltprodukt der Sonde, das weiterhin auf der Oberfläche des Arrays immobilisiert ist, gekoppelt bleibt.

Ferner ist es bevorzugt, daß die selektiv spaltbare Bindung in den Sonden derart beschaffen ist, daß sie die molekulare Wechselwirkung zwischen Sonden und Targets nicht beeinträchtigt. So ist gewährleistet, daß die Spezifität des Nachweises nicht durch die Modifizierung von Sondenmoleküle unter Einführung einer selektiv spaltbaren Bindung vermindert wird.


Des weiteren ist es bevorzugt, daß die selektiv spaltbare Bindung derart beschaffen ist, daß die Wechselwirkung zwischen Sonden und Targets während der selektiven Spaltung der selektiv spaltbaren Bindung vollständig erhalten bleibt.


Bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays weisen alle Sonden auf dem Sonden-Array sowohl mindestens eine spaltbare Bindung als auch mindestens eine Markierung auf. Bei weiteren Ausführungsformen kann es bevorzugt sein, daß mindestens eine Sonde sowohl mindestens eine spaltbare Bindung als auch mindestens eine Markierung aufweist, während andere Sonden nur mindestens eine Markierung oder nur mindestens eine spaltbare Bindung oder weder eine Markierung noch eine spaltbare Bindung aufweisen.

Vorzugsweise sind auf mindestens einem Array-Element des Sonden-Arrays Sondenmoleküle angeordnet, die keine selektiv spaltbare Bindung aufweisen. Bei dieser bevorzugten Ausführungsform weisen alle Sonden des Sonden-Arrays eine Markierung auf. Ein Teil der Sonden verfügt zusätzlich über eine labile Bindung, während zu Standardisierungszwecken eingesetzte Sonden keine spaltbare Bindung aufweisen. Letztere werden im Verlauf des Assays ihre Markierung nicht durch spezifische Spaltung der labilen Bindung verlieren. Da sie jedoch allen Schritten des Assays ausgesetzt sind, unterliegen sie wie alle anderen Sonden der mit diesen Schritten verbundenen unspezifischen Abnahme des Markierungssignals. Folglich können diese Sonden als Standards dienen, deren Signale die Obergrenze der nach dem Assay zu detektierenden Signale und damit die Obergrenze des dynamischen Bereiches der Analyse liefern. Diese Sonden können folglich zur Normierung verschiedener Experimente untereinander eingesetzt werden.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die nicht mit einer selektiv spaltbaren Bindung versehenen Sondenmoleküle auf verschiedenen Array-Elementen angeordnet, die sich in ihrem Markierungsgrad unterscheiden. So können einige Array-Elemente ausschließlich markierte Sonden enthalten, während in anderen Array-Elementen ein Gemisch

aus markierten und nicht markierten Sonden angeordnet ist. Besonders bevorzugt liegen die mit einem Gemisch aus markierten und unmarkierten Sonden versehenen Array-Elemente in Form einer Verdünnungsreihe vor. Das bedeutet, daß sich die jeweiligen Array-Elemente im Verhältnis von markierten zu unmarkierten Sonden charakteristisch und definiert unterscheiden.

 Im Falle von erfindungsgemäßen Arrays, die durch Immobilisierung separat synthetisierter Sonden erzeugt werden, kann der unterschiedliche Markierungsgrad durch Mischung von markierten und unmarkierten Sonden vor deren Immobilisierung erreicht werden. Bei Arrays, die durch in situ-Synthese erzeugt werden, kann beispielsweise die Markierung bewirkende Monomere während der Kopplung mit einem unmarkierten Monomer gleicher Reaktivität gemischt werden.

 Die einen abgestuften Markierungsgrad aufweisenden Array-Elemente können zur Normierung des Experimentes eingesetzt werden. Zum einen repräsentieren sie die obere und untere Grenze des detektierbaren Bereichs. Zum anderen können im Rahmen der Auswertung die an den Array-Elementen ermittelten Signalintensitäten gegen den Markierungsgrad der Sonden aufgetragen werden, so daß eine Kennlinie des Array-Experimentes entsteht, gegen die die experimentellen Werte, d.h. die Werte, die an Array-Elementen mit über eine labile Bindung verfügenden Sonden erhalten werden, abgeglichen werden können.

Die nicht mit einer labilen Bindung versehenen Sonden können aus einer Vielzahl chemischer Verbindungen, die an Oberflächen gekoppelt werden können, ausgewählt werden.


Vorzugsweise handelt es sich bei den nicht mit einer labilen Bindung versehenen Sonden jedoch um Moleküle, die chemisch den zur Detektion von Wechselwirkungen verwendeten Sonden weitgehend gleichen, wie z.B. Oligonukleotidsonden bei Hybridisierungs-basierten Assays. Besonders bevorzugt handelt es sich bei den Sondenmolekülen um Oligonukleotide einer definierten oder randomisierten Sequenz.

Bei einer weiteren Ausführungsform können die zur Normierung verwendeten Array-Elemente auch direkt, d.h. ohne Verknüpfung mit einem Sondenmolekül mit detektierbaren Einheiten versehen werden. Bei dieser Ausführungsform sind auf mindestens einem Array-Element detektierbare Einheiten ohne Verknüpfung mit einem Sondenmolekül angeordnet. Unterschiedliche Signalintensitäten werden dann bevorzugt durch Mischung der detektierbaren Einheiten mit nicht detektierbaren Einheiten gleicher Reaktivität bei deren Kopplung an die Oberfläche erreicht.

Bei einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Sonden-Arrays weisen alle Sonden mit labiler Bindung eine spezifische Affinität zu den in der zu untersuchenden Probe zu erwartenden Targets auf.


Vorzugsweise sind allerdings auf mindestens einem Array-Element des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays Sondenmoleküle angeordnet, die keine oder zumindest keine spezifische Affinität zu Targetmolekülen aufweisen. D.h., auf einigen Array-Elementen sind Sonden abgelegt, die keine Affinität zu im Sample zu erwartenden Targets aufweisen, bzw. deren Affinität zu Targets im Sample nicht zu einem detektierbaren Signal führt. Nach Spaltung der labilen Bindung wird die detektierbare Einheit bei diesen Sonden nicht von einer spezifischen Wechselwirkung mit zwischen Sonde und Target am Array zurückgehalten. Diese Sonden dienen daher als Kontrolle der Effizienz der Spaltungsreaktion. Sie definieren den dem Experiment inhärenten Signalhintergrund und damit das untere Ende des detektierbaren Bereiches.

Vorzugsweise sind die keine oder zumindest keine spezifische Affinität zu Targetmolekülen aufweisenden Sondenmoleküle Oligonukleotide mit einer definierten oder randomisierten Sequenz. So kann im Fall von Nukleinsäuren bzw. Nukleinsäure-Analoga als Sonden die Sequenz der Sonden so gewählt werden, daß sie keine signifikante Komplementarität zu



Targets im Sample ausweist. Dies ist insbesondere bei Samples mit qualitativ definierter Zusammensetzung praktikabel. Bei Samples unbekannter Zusammensetzung können anstelle von definierten Sequenzen zumindest teilweise randomisierte Sequenzen Verwendung finden. Diese umfassen zwar möglicherweise Sequenzen, die zu in der Probe vorhandenen Targets komplementär sind. Der Anteil jeder einzelnen derart erzeugten spezifischen Sequenz beträgt bei vollständig-randomisierten Array-Elementen jedoch lediglich $1/4^n$, wobei n für die Länge der Sonde steht. Aufgrund der geringen Menge jeder einzelnen spezifischen Sequenz führt deren Wechselwirkung mit im Sample vorhandenen Targets zu einem summarischen Signal, das unter der Detektionsgrenze liegt.


Bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays sind alle mit einer spaltbaren Bindung versehenen und gegen Targetsequenzen gerichteten Sonden komplementär zu natürlich im Target vorkommenden Sequenzen.




Alternativ sind auf mindestens einem Array-Element Sondenmoleküle angeordnet, die eine spezifische Affinität für zu der Probe vorzugsweise in bekannter Konzentration extern zugegebene Targetmoleküle aufweisen. Bei dieser Ausführungsform sind auf dem Array Sonden mit labiler Bindung angeordnet, die gegen Targets gerichtet sind, die dem Sample zum Zwecke der Standardisierung zugegeben werden. Dies wird als „spiking“ bezeichnet. Eine Konzentrationsabstufung unterschiedlicher als spiking-Proben zugegebener Targets erlaubt eine weitere Standardisierung des Assays.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays sind auf mindestens einem Array-Element sog. Kontrollsonden angeordnet, die eine Markierung und eine selektiv spaltbare Bindung, angeordnet zwischen Markierung und Immobilisierungsstelle der Sonde auf der Oberfläche, aufweisen. Derartige Kontrollsonden weisen eine spezifische Affinität, d.h. im Falle von Oligonukleotidsonden eine Komplementarität, entweder zu einem extern zugegebenen Target oder zu einem in allen mit

dem Array zu untersuchenden Samples in ausreichender Konzentration vorhandenen Target auf. Unter ausreichender Konzentration wird in diesem Zusammenhang eine Konzentration an Targetmolekülen verstanden, die zu einem signifikanten, d.h. deutlich detektierbaren Signal nach der Wechselwirkung mit den Sonden führt.




Vorzugsweise sind die Array-Elemente, auf denen derartige Kontrollsonden angeordnet sind, über die gesamte Fläche des Arrays verteilt, besonders bevorzugt sind sie gleichmäßig verteilt. Eine Verteilung über die gesamte Fläche des Arrays bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung, daß sich ausgehend von dem Mittelpunkt der Array-Oberfläche in verschiedenen Abständen und verschiedenen Richtungen Array-Elemente mit derartigen Kontrollsonden befinden. Ein gleichmäßige Verteilung bedeutet vorzugsweise eine Anordnung der Array-Elemente mit derartigen Kontrollsonden als einheitliches Raster, beispielsweise als 10x10-Raster, bei dem jedes zehnte Array-Element ein derartiges Array-Element mit Kontrollsonden ist. Diese Ausführungsform ermöglicht die Normalisierung von experimentellen Schwankungen, die nach der Herstellung des Arrays u.a. in Abhängigkeit von dem Ort des Array-Elements auf der Array-Oberfläche auftreten können.




Wie bereits vorstehend erwähnt, ist die Markierung, die an die Sonden, vorzugsweise die Oligonukleotidsonden, gekoppelt ist, vorzugsweise eine detektierbare Einheit oder eine über eine Ankergruppe an die Sonden gekoppelte detektierbare Einheit. Hinsichtlich der Möglichkeiten der Detektion bzw. der Markierung erweist sich der erfindungsgemäße Sonden-Array im Vergleich zu den Sonden-Arrays des Standes der Technik als äußerst flexibel, da die Markierungseffizienz nicht von der Sequenz, Struktur oder sonstigen Beschaffenheit der (unbekannten) Targetmoleküle abhängt. So sind Verfahren unter Verwendung des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays mit einer Vielzahl physikalischer, chemischer oder biochemischer Detektionsverfahren kompatibel. Voraussetzung ist lediglich, daß die zu detektierende Einheit bzw. Struktur direkt an eine Sonde, beispielsweise ein

Oligonukleotid, gekoppelt bzw. über eine mit dem Oligonukleotid koppelbare Ankergruppe verknüpft werden kann.




Die Detektion der Markierung kann beispielsweise auf Fluoreszenz, Magnetismus, Ladung, Masse, Affinität, enzymatischer Aktivität, Reaktivität, einer Goldmarkierung und dergleichen beruhen. Vorzugsweise kann die Markierung bei den erfindungsgemäßen Sonden-Arrays in jeder Phase der Verwendung des Arrays detektiert werden. Dadurch wird beispielsweise eine Einschätzung der Qualität der Arrays gewährleistet, indem die Belegungsdichte jedes einzelnen Array-Elemente ermittelt werden kann.




Das erfindungsgemäße Sonden-Array gestattet ebenfalls eine Detektion mit nicht auf Fluoreszenz basierenden Methoden. Vorzugsweise basiert die Markierung allerdings auf der Verwendung von Fluorophor-markierten Strukturen bzw. Bausteinen. In Verbindung mit der Fluoreszenzdetektion kann die Markierung ein beliebiger an Sonden während oder nach deren Synthese koppelbarer Farbstoff sein. Beispiele hierfür sind Cy-Farbstoffe (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), Alexa-Farbstoffe, Texas-Rot, Fluorescein, Rhodamin (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), Lanthanide wie Samarium, Yterbium und Europium (EG&G Wallac, Freiburg, Deutschland).

Neben Fluoreszenzmarkern können im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Markierung bzw. als Detektiereinheit, die mit den Sonden gekoppelt ist, auch Lumineszenzmarker, Metallmarker, Enzymmarker, radioaktive Marker und/oder polymere Marker eingesetzt werden.

Ebenso kann eine Nukleinsäure als Markierung (Tag) genutzt werden, die durch Hybridisierung mit einer markierten Reportersäure detektiert werden kann (Sandwichhybridisierung). Einsatz finden zum Nachweis des Tags diverse molekularbiologische Nachweisreaktionen wie Primerextension, Ligation und RCA.



Bei einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays ist die detektierbare Einheit über eine Ankergruppe mit den Sonden gekoppelt. Bevorzugt verwendete Ankergruppen sind Biotin, Digoxigenin und dergleichen. Die Ankergruppen werden in einer anschließenden Reaktion mit spezifisch bindenden Komponenten, beispielsweise Streptavidin-Konjugaten oder Antikörper-Konjugaten umgesetzt, die selbst detektierbar sind, oder eine detektierbare Reaktion auslösen. Bei Einsatz von Ankergruppen kann die Umsetzung der Ankergruppen in detektierbare Einheiten vor, während oder nach Zugabe der Probe umfassend die Targets sowie vor, während oder nach der Spaltung der selektiv spaltbaren Bindung in den Sonden erfolgen. Bevorzugt ist allerdings die Umsetzung der Ankergruppen in detektierbare Einheiten nach der Herstellung des Sonden-Arrays und insbesondere vor der Spaltung der Sonden, um die Qualität des hergestellten Sonden-Arrays zu überprüfen.



Die Markierung kann erfindungsgemäß auch durch Wechselwirkung eines markierten Moleküls mit den Sondenmolekülen erfolgen. Beispielsweise kann die Markierung durch Hybridsierung eines wie vorstehend beschrieben markierten Oligonukleotids mit einer Oligonukleotidsonde erfolgen.

Weitere im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignete Markierungsverfahren und Nachweissysteme sind beispielsweise in Lottspeich und Zorbas, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin 1998, Kapitel 23.3 und 23.4 beschrieben.

Bei einer weiteren alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays werden Nachweisverfahren verwendet, die im Ergebnis ein Addukt mit einem bestimmten Löslichkeitsprodukt, das eine Präzipitation zur Folge hat, liefern. Zur Markierung werden Substrate eingesetzt, die in ein schwer lösliches, üblicherweise gefärbtes Produkt umgesetzt werden können. Beispielsweise können bei dieser Markierungsreaktion Enzyme verwendet

werden, die den Umsatz eines Substrats in ein schwer lösliches Produkt katalysieren. Eine Reihe von in Frage kommenden Reaktionen, die geeignet sind, um zu einem Niederschlag an Array-Elementen zu führen, sowie Möglichkeiten für die Detektion des Niederschlags sind beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung WO 01/07575 beschrieben.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Sonden-Arrays, das die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Synthese von Sondenmoleküle, die eine Markierung aufweisen und zwischen der Stelle ihrer Immobilisierung auf der Array-Oberfläche und der Markierung eine selektiv spaltbare Bindung aufweisen; und
- b) ortsspezifische Immobilisierung der Sondenmoleküle über eine definierte Position innerhalb des Sondenmoleküls auf der Array-Oberfläche.

Bei einer alternativen Ausführungsform des Verfahrens zur Herstellung eines vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Sonden-Arrays erfolgt die Herstellung durch in situ-Synthese der Sondenmoleküle auf vorbestimmten Positionen der Array-Oberfläche, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellung einer Array-Oberfläche, die mit geeigneten Reagenzien aktiviert werden kann bzw. mit Schutzgruppen versehen ist;
- b) Kopplung bzw. Immobilisierung von Untereinheiten der zu synthetisierenden Sondenmoleküle an vorbestimmte Stellen auf der Array-Oberfläche vorzugsweise durch Deposition der Untereinheit, wobei die Kopplung an vorbestimmten Stellen vorzugsweise durch Aktivierung bzw. Entschützung der Array-Oberfläche und anschließende Kopplung der Untereinheit erfolgt;

c) in situ-Synthese der Sondenmoleküle aufbauend auf den in Schritt b) gekoppelten bzw. immobilisierten Untereinheiten unter Einbau einer Markierung und einer selektiv spaltbaren Bindung zwischen der Stelle der Immobilisierung der Sondenmoleküle auf der Array-Oberfläche und der Markierung.

Geeignete Reagenzien zur Aktivierung der Array-Oberfläche in Schritt b) des vorstehend genannten Verfahrens bzw. geeignete Schutzgruppen für die Array-Oberfläche sind dem Fachmann bekannt.

Die Immobilisierung von Molekülen auf der Array-Oberfläche kann entweder spezifisch oder unspezifisch erfolgen. Die spezifische Immobilisierung setzt eine Selektivität der Wechselwirkung bestimmter chemischer Funktionen des zu immobilisierenden Moleküls mit der Oberfläche des Substrats voraus. Ein Beispiel für eine spezifische nichtkovalente Immobilisierung ist die Bindung von Biotin-markierter Nukleinsäure an ein mit Streptavidin beschichtetes Substrat. Aminomodifizierte Nukleinsäuren lassen sich spezifisch über die Reaktion der Aminogruppe mit einem Epoxid, einer Carboxy-Funktion oder einem Aldehyd immobilisieren. Vorzugsweise wird die Immobilisierung bei dem erfindungsgemäßen Verfahren über eine endständige Phosphatgruppe der Sonde bzw. eines Monomer-Bausteins einer Biopolymer-Sonde an einer aminierten Oberfläche durchgeführt.

Die unspezifische Immobilisierung erfolgt über eine Vielzahl von Mechanismen und chemischen Funktionen und kann sowohl kovalent als nicht kovalent sein. Beispiel hierfür ist die Immobilisierung von Nukleinsäuren auf poly-L-Lysin, aber auch die Immobilisierung von chemisch nicht modifizierten Nukleinsäuren auf epoxidierten, aminierten oder mit Aldehyd-Funktionen besetzten Substratoberflächen.

Vorzugsweise erfolgt die Immobilisierung der Sonden auf der Array-Oberfläche kovalent.

Für das Ablegen geringer Mengen Material an vorgesehenen Stellen auf einem Substrat im Rahmen des erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens existieren eine Vielzahl von Verfahren, von denen einige im folgenden aufgeführt sind. Eine Reihe derartiger Verfahren sind beispielsweise in D.J. Lockhart, E.A. Winzeler; Genomics, gene expression and DNA arrays; Nature, Vol. 405, S. 827-836, Juni 2000 beschrieben. In US 6,040,193 ist ein Verfahren beschrieben, das unter Einsatz von hydrophil strukturierten Arealen den Aufbau von Arrays durch Deposition von Tropfen aus einer Kapillare gestattet. In EP 0 268 237 ist ein Druckkopf beschrieben, der eine solche Deposition von geringen Mengen Material ebenfalls gewährleistet. Bekannt ist das Ablegen von Tropfen mit Hilfe von Transferradeln. Diese Nadeln können auch geschlitzt sein, so daß in Analogie zur Feder eines Füllfederhalters Flüssigkeit an eine Vielzahl von Stellen auf einem Substrat gebracht werden kann (siehe z.B. US 6,269,846, US 6,101,946, US 6,235,473, US 5,910,288). In US 4,877,745 ist ein Gerät beschrieben, daß die Erzeugung molekularer Arrays durch Pipettieren geringer Mengen an Material erlaubt. In US 5,731,152 ist ein Pipettierwerkzeug beschrieben, daß gleichzeitig die Deposition einer Vielzahl von unterschiedlichen Sonden ermöglicht. In US 5,551,487 ist ein der Ink-Jet-Technik entlehnter Druckkopf zur Erzeugung molekularer Sonden-Arrays beschrieben. Spezielle Werkzeuge zur Spot-weisen Deposition von Material auf Oberflächen sind u.a. auch in US 5,807,522 beschrieben und zitiert. Die Möglichkeit der Immobilisierung von Sonden unter Zuhilfenahme elektrischer Felder ist aus US 5,434,049 bzw. WO 97/12030A1 bekannt.

Dadurch daß die Sonden bei der Herstellung des Sonden-Arrays über eine definierte Position innerhalb des Sondernukleus auf dem Array immobilisiert werden, können bei Spaltung der labilen Bindung die Markierungen von solchen Sonden, an denen keine spezifische Wechselwirkung mit Targets stattgefunden hat, effizient von der Oberfläche entfernt werden. Insbesondere wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren vermieden, daß weitere stabile Kontakte von Sonden und Oberfläche im Bereich zwischen labiler Bindung und detektierbarer Einheit aufgebaut werden.

Eine derartige spezifische Verknüpfung zwischen Sonde und Oberfläche kann nur bedingt durch Immobilisierung von separat, d.h. vor der Immobilisierung vollständig synthetisierten Sonden, gewährleistet werden. Somit sind derartige kovalente Immobilisierungsverfahren nicht für das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren bevorzugt. Dies gilt auch für nicht-kovalente Immobilisierungsverfahren, die für bestimmte Anwendungen keine hinreichende Stabilität der Verknüpfung gewährleisten.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde dagegen gefunden, daß eine sehr definierte Verknüpfung der Sonden mit der Oberfläche durch in situ-Synthese der Sonden auf der Oberfläche erreicht werden kann. Vorzugsweise erfolgt die Synthese der Sonden, insbesondere bei der Verwendung von Oligonukleotidsonden, somit in situ auf definierten Positionen der Array-Oberfläche.

Die in situ-Synthese von Sondenmolekülen auf Oberflächen ist ein Spezialfall der Immobilisierung. Dabei werden Monomere einer polymeren Verbindung auf der Oberfläche immobilisiert, vorzugsweise kovalent immobilisiert. Anschließend wird auf der Oberfläche das Sondenmolekül in situ synthetisch erzeugt. Besonders bevorzugt erfolgt die Synthese von Oligonukleotidsonden in situ, d.h. an der festen Phase unter Verwendung von Phosphoramiditbausteinen.

Im folgenden werden eine Reihe von Verfahren beschrieben, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Herstellung von molekularen Sonden-Arrays insbesondere unter Verwendung der Phosphoramidit-Methode bei der Nukleinsäuresynthese geeignet sind. Die Verfahren sind ohne den Anspruch der Vollständigkeit exemplarisch aufgeführt, weitere Verfahren und Verfahrenserweiterungen sind bekannt und denkbar.


In US 5,658,734 wird ein Verfahren beschrieben, bei dem zur Bestimmung der Sonden-Elements Photoresists Einsatz finden. In US 6,001,311, US 5,985,551 und US 0,574,796 sind Verfahren beschrieben, die den sukzessiven Aufbau von Oligonukleotiden und anderen Polymeren unter Einsatz spezieller strukturierter Substrate mit hydrophilen reaktiven Bereichen und hydrophoben nicht reaktiven Bereichen und unter Verwendung von Pipetten gestatten. Aus US 5,885,837, US 5,384,261, WO 93/09668, WO 97/33737 und WO 98/36827 ist bekannt, daß mechanische Barrieren geeignet sein können, die Synthese von Polymeren an bestimmten Stellen einer Oberfläche zu ermöglichen. Das Stempeln von Monomeren bzw. Reagenzien ist in DE 197 06 570 beschrieben. Aus WO 90/15070, EP 0 386 229, US 5,436,327, US 5,667,667, WO98/56505 und WO95/21265 sind synthetisch aufgebaute Sonden-Arrays ebenfalls hinlänglich bekannt. Verfahren aus der Druckereitechnik werden in US 6,239,273 auf die Herstellung von Sonden-Arrays adaptiert.

Bevorzugt werden bei dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren labile Bindungen, deren Synthese sich möglichst nahtlos in die nach der Phosphoramidit-Methode erfolgende in situ-Synthese der Arrays einfügt. Besonders bevorzugt handelt es sich bei der selektiv spaltbaren Bindung um eine zwei Nukleoside verbrückende Phosphothioat-Bindung.


Ein für bestimmte Anwendungen des erfindungsgemäßen Sondenarrays erforderlicher definierter Markierungsgrad auf einem Array-Element kann beispielsweise dadurch erreicht werden, daß während der Synthese eine Mischung aus einem markierten Monomer, vorzugsweise einem Nukleotidmonomer, und einem unmarkierten Monomer, vorzugsweise einem Nukleotidmonomer, gleicher Reaktivität vorzugsweise in einem definierten Verhältnis zugegeben wird.

Eine weitere Aufgabe besteht darin, für die Sonden-Synthese insbesondere nach der Phosphoramidit-Methode geeignete Monomer-Bausteine zur Synthese der labilen Bindung bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von für die Nukleinsäure-Synthese geeigneten Monomer-Bausteinen, die zur Erzeugung einer labilen Bindung in Sondenmolekülen dienen können, gelöst, das die folgenden Schritte umfaßt:

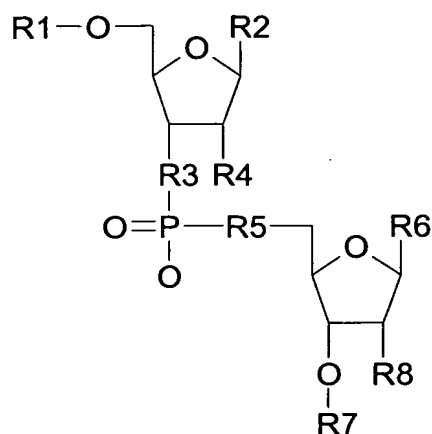
- 
- a) Veresterung der 5'-OH-Gruppe eines Nukleosids mit einer als Abgangsgruppe geeigneten Säure;
 - b) Umsetzung des Esters mit einem Thioester;
 - c) Verseifung des Thioesters zu einem Thiol;
 - d) Schutz der Thiol-Funktion mit für die Phosphotriester- oder Phosphoramidit-Methode geeigneten Schutzgruppen;
 - e) Aktivierung des geschützten Thiols an der 3'-Position mit der Phosphotriester- oder Phosphoramidit-Methode.

Geeignete Reagenzien und Reaktionsbedingungen sind dem Fachmann insbesondere unter Berücksichtigung der in den Beispiel 1 beschriebenen Synthese geläufig.



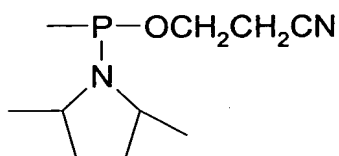
Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind die durch die vorstehende erfindungsgemäße Synthese hergestellten Monomer-Bausteine, wie beispielsweise 5'-S-(Dimethoxytrityl)-mercapto-5'-deoxynucleosid-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropylphosphite).

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind Nukleotid-Dimere mit der folgenden Formel III, die u.a. aus den vorstehend genannten Monomer-Bausteinen beispielsweise nach der Phosphoramidit-Methode hergestellt werden können.

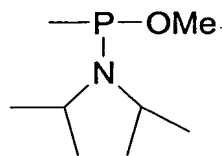


III,

wobei R1 vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus DMTr- (Dimethoxytrityl), MMTr- (Monomethoxytrityl), Tr- (Trityl), 9-Phenylxanthen-9-yl-, Pixyl- und Silyl-Gruppen; R2 und R6 unabhängig voneinander vorzugsweise stehen für A, G, C, T und U; R3 vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus O, S und NH; R4 vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H, OH und O-Alkyl; R5 vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus O, S und NH; R8 vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H, OH und O-Alkyl; und R7 vorzugsweise aus einer der beiden folgenden Gruppen mit den Formeln IV und V ausgewählt ist:



IV



V

Selbstverständlich können die erfindungsgemäßen Dimere mit der Formel III auch als Nukleotid-Dimere S zum Aufbau der Sondenmoleküle, umfassend eine Nukleinsäure der


vorstehend genannten Formel A_1-S-A_2 , bei dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren eingesetzt werden.

Der Aufbau der erfindungsgemäßen Sonden-Arrays bzw. der durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellten Arrays ermöglicht einen bislang nicht erreichten, verlässlichen und einfach zu überwachenden Standardisierungsgrad und damit ein hohes Qualitätsniveau. Da die Sonden auf dem Sonden-Array bei der Herstellung des Arrays mit einer Markierung versehen sind, kann die Qualität des erzeugten Arrays durch ein einfaches bildgebendes Verfahren überprüft werden. Die Intensität der jeweiligen Spots ist ein Maß für die Synthese- und Immobilisierungseffizienz der jeweiligen Sonde.

Ein weiterer Vorteil neben der Möglichkeit der Qualitätsprüfung der hergestellten Arrays liegt in der Möglichkeit der Standardisierung und damit Absicherung der unter Verwendung des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays erhaltenen Meßergebnisse. So kann beispielsweise stichprobenartig ein funktioneller Test, ein sogenanntes Standard-Assay, durchgeführt werden. Dabei kann beispielsweise ein in Konzentration und Zusammensetzung definiertes Gemisch an Targets mit dem Sonden-Array bzw. Chip wechselwirken und anschließend die Detektionsreaktion durchgeführt werden. Das Resultat der Wechselwirkung der Sonden mit den Targets nach der Abspaltung der Sonden, die nicht selektiv mit Targets wechselgewirkt haben, wird mit einem bildgebenden Verfahren dokumentiert. Der Vergleich der Experimente vor und nach Zugabe der Targets erlaubt Aussagen zur Qualität der Immobilisierung bzw. Synthese der jeweiligen Sonden.

Des weiteren wird durch den speziellen Aufbau der erfindungsgemäßen Sonden-Arrays eine standardisierte bzw. normierte Auswertung des Assays ermöglicht. Dies beruht darauf, daß anhand des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays Abbildungen von verschiedenen Zeitpunkten des Experiments vorliegen, nämlich solche, die vor Zugabe der Probe gewonnen werden, und solche, die nach der Wechselwirkung der Sonden mit den Targets gewonnen wurden. Durch


geeignete mathematische Verfahren können unter Einbeziehung dieser Daten, sowie der Daten, die bei der Qualitätsprüfung der Arrays gefunden wurden, experimentelle Ergebnisse in einem für Array-Anwendungen bislang nicht erreichten Maß standardisiert und abgesichert werden. Die erfindungsgemäßen Sonden-Arrays gestatten somit ein neues Qualitätsniveau bei Arrayexperimenten und eröffnen neue Anwendungsfelder für die Arraytechnologie.



Die Verfahren der Qualitätsprüfung der hergestellten Sonden-Arrays sowie der Standardisierung und Normierung des Nachweises von Sonden-/Target-Wechselwirkungen bei Verwendung der erfindungsgemäßen Sonden-Arrays sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung und werden nachstehend detailliert beschrieben.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Überprüfung der Qualität der vorstehend beschriebenen Sonden-Arrays bzw. der nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren hergestellten Sonden-Arrays, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellung eines erfindungsgemäßen Sonden-Arrays;
- b) Detektion der auf der Array-Oberfläche immobilisierten synthetisierten Sondenmoleküle.



Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Qualitätskontrolle besteht darin, daß sich die Qualität jedes Arrays nach dessen Herstellung ohne die Notwendigkeit weiterer Prozeßschritte ermitteln läßt. Dies wird dadurch gewährleistet, daß die Sonden auf dem Sonden-Array nach dessen Fertigstellung mit einer detektierbaren Einheit versehen sind.

In Verbindung mit dem Qualitätsmanagement ist eine direkt zu detektierende Markierung wie beispielsweise der Einsatz von Fluoreszenzmarkern und/oder radioaktiven Markern bevorzugt. In alternativen Ausführungsformen könne jedoch auch Ankergruppen oder durch Sekundärreaktionen zu detektierende Einheiten Verwendung finden.

Üblicherweise wird von jedem Array nach dessen Fertigstellung die Belegungsdichte der einzelnen Array-Elemente anhand der Intensität der durch die Marker erzeugten Signale bestimmt. Dies erfolgt bevorzugt mit einem bildgebenden Verfahren, welches die Signalintensitäten in Graustufen abbildet, welche dann durch geeignete Software-Werkzeuge, wie z.B. Iconoclust (Clondia, Jena, Deutschland), Quantarray (GSI Lumonics) quantitativ ausgewertet werden können. Direkte, nicht bildgebende Verfahren können alternativ ebenfalls Verwendung finden.

Bei serieller Einzelproduktion von Arrays kann jeder Chip einzeln abgebildet werden. Erfolgt die Herstellung der Arrays parallel, beispielsweise im Wafermaßstab, kann die Belegungsdichte alternativ für jeden Chip einzeln oder parallel mit einem hochauflösenden Verfahren über den gesamten Wafer durchgeführt werden.


Die Analyse der Belegungsdichte wird erfindungsgemäß dazu verwendet, Arrays zu identifizieren, die für die Durchführung von Experimenten nicht oder nur bedingt geeignet sind. Diese sind beispielsweise:

- Array-Elemente mit zu geringer Belegungsdichte;
- Array-Elemente mit einer zu hohen Abweichung der Belegungsdichte im Vergleich zur durchschnittlichen (zu erwartenden) Belegungsdichte dieses Array-Elements auf den erzeugten Arrays;
- Array-Elemente mit inhomogener Belegungsdichte auf dem Array;
- Array-Elemente ohne Signal.


Die Werte werden vorzugsweise verwendet, um Arrays zu verwerfen bzw. nicht verwendbare Array-Elemente zu markieren. Die Ergebnisse der Qualitätsüberprüfung können beispielsweise in einer Datenbank wie Partisan (Clondia) gegebenenfalls gemeinsam mit

anderen relevanten Daten zur Array-Herstellung und –Verwendung gespeichert werden. Verworfen Arrays können mit einem Flag versehen und zur Benutzung gesperrt werden.

Die Auswertung der Belegungsdichte erfolgt vorzugsweise computergestützt und/oder automatisiert. Schwellwerte zum Verwerfen von Arrays bzw. Markieren ungeeigneter Array-Elemente richten sich nach der jeweilig gewünschten Verwendung der Arrays.



Bei einem weiteren wesentlichen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von Targets aus einer Probe durch molekulare Wechselwirkungen zwischen Sonden und Targets auf Sonden-Arrays bereitgestellt, das die folgenden Schritte umfaßt:

- 
- a) Bereitstellung eines wie vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Sonden-Arrays;
 - b) gegebenenfalls Detektion der auf der Array-Oberfläche immobilisierten Sondenmoleküle in Form von Signalintensitäten;
 - c) Inkubation des Sonden-Arrays mit der zu untersuchenden Probe;
 - d) gegebenenfalls Waschen unter Bedingungen, unter denen eine spezifische Wechselwirkung zwischen Target- und Sondenmolekül weitgehend stabil bleibt und unspezifisch gebundene Targets entfernt werden;
 - e) gegebenenfalls erneute Detektion in Form von Signalintensitäten;
 - f) selektive Spaltung der selektiv spaltbaren Bindung in den Sondenmolekülen;
 - g) gegebenenfalls Waschen, um nicht durch eine Wechselwirkung mit Targetmolekülen an der Array-Oberfläche zurückgehaltene markierte Sondenmolekül-Fragmente zu entfernen;
 - h) Detektion der durch eine Wechselwirkung mit Targetmolekülen auf der Array-Oberfläche verbliebenen markierten Sondenmolekül-Fragmente in Form von Signalintensitäten; und
 - i) gegebenenfalls Normierung der in Schritt h) detektierten Signalintensitäten.

Im Vergleich zu den bislang bekannten Verfahren zum Nachweis von Sonden-/Target-Wechselwirkung auf Sonden-Arrays bietet das erfindungsgemäße Verfahren zwei wesentliche Vorteile.

Zum einen entfällt die Notwendigkeit der Markierung der Targets. Somit werden alle vorstehend beschriebenen Fehler und Schwankungen, die im Prozeß der Markierung des Targets auftreten können, vollständig vermieden.

Zum anderen sind bereits die Array-Elemente des erfindungsgemäßen Arrays mit einer Markierung bzw. einer detektierbaren Einheit versehen. Dadurch kann die Qualität des Arrays wie vorstehend beschrieben vor dem Nachweis-Experiment auf Ebene der einzelnen Array-Elemente ermittelt werden. Die dabei für die jeweiligen Array-Element erhaltenen Signalintensitäten, die der Belegungsdichte für das jeweilige Array-Element entsprechen, können für eine Normalisierung der experimentellen Ergebnisse, d.h. der nach der Sonden-/Target-Wechselwirkung erhaltenen Signalintensitäten herangezogen werden.

Somit können mit dem erfindungsgemäßen Nachweisverfahren die wesentlichen Ursachen für Ungenauigkeiten bei Array-basierten Assays beseitigt werden.

Üblicherweise wird die Qualität des Arrays bereits nach der Herstellung überprüft, so daß die für die Normierung bzw. Standardisierung erforderlichen Belegungsdichten dem Anwender des erfindungsgemäßen Verfahrens bereits zur Verfügung stehen. In diesem Fall ist Schritt b) des erfindungsgemäßen Verfahrens nicht erforderlich. Falls gewünscht, kann die Qualität des bereitgestellten Arrays anhand der optional in Schritt b) detektierten Signalintensitäten zum Zeitpunkt der Verwendung des Arrays auch im Rahmen des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens erneut oder erstmals überprüft werden.


Im folgenden werden einige weitere Ausführungsformen beschrieben, mit denen eine Normierung bzw. Normalisierung bzw. Standardisierung der Ergebnisse gewährleistet wird. Als Normierung bzw. Normalisierung wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung das Gewährleisten der Vergleichbarkeit der auf einem Sonden-Array detektierten Signalintensitäten verstanden, während als Standardisierung das Gewährleisten der Vergleichbarkeit von auf verschiedenen Arrays durchgeführten Experimenten verstanden wird.

Die Normalisierung der Array-Experimente basiert auf den vorstehend beschriebenen besonderen Eigenschaften des erfindungsgemäßen Arrays. Der Aufbau des erfindungsgemäßen Arrays bietet dabei verschiedene Möglichkeiten zur Auswertung von Array-Experimenten. Der Normierungs- und Standardisierungsgrad kann den Erfordernissen des konkreten Experimentes bzw. Nachweisverfahrens angepaßt werden und wird bei quantitativen Analysen höher sein als bei Analysen, mit denen Ja/Nein-Aussagen getroffen werden sollen.


Bei einer Ausführungsform werden bei der Qualitätskontrolle der Arrays für jedes Array-Element Signalintensitäten S_0 ermittelt, die ein Maß für die Belegungsdichte des jeweiligen Array-Elements darstellen. Diese Signalintensitäten werden in Korrekturfaktoren k_a umgerechnet, die zur Normalisierung der auf jedem einzelnen Array-Element nach Abschluß des Experimentes gemessenen Signalstärke eingesetzt werden.

Vorzugsweise wird k_a bestimmt, indem die Signalstärken S_0 aller Array-Elemente gemittelt und die durchschnittliche Signalstärke aller Array-Elemente durch die Signalstärke S_0 jedes Array-Elementes geteilt wird. Alternativ wird k_a durch eine andere mathematische Verknüpfung aus der Signalintensität S_0 der Array-Elemente vor dem Experiment ermittelt.

Der Korrekturfaktor k_a kann erfindungsgemäß dazu verwendet werden, um die durch die unterschiedliche Belegungsdichte der Array-Elemente bedingten Schwankungen in der Signalintensität S_1 nach erfolgter Wechselwirkung mit dem Target, dem Schneiden der labilen Bindung und dem optionalen Waschen zu korrigieren. Die korrigierte Signalintensität wird als S_2 bezeichnet.

 Im einfachsten Fall ergibt sich S_2 aus S_1 durch mathematische Verknüpfung mit k_a . Vorzugsweise stellt die mathematische Verknüpfung eine Multiplikation dar. Besonders bevorzugt wird die Art der mathematischen Verknüpfung für den jeweiligen Arraytyp und den jeweiligen Sampletyp experimentell optimiert.

Bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens erfolgt die Normierung in Schritt i) somit durch mathematische Verknüpfung der in Schritt h) erhaltenen Signalintensitäten mit einem Korrekturfaktor, der anhand der bei der Qualitätsprüfung in Schritt b) erhaltenen Signalintensitäten ermittelt werden kann.

 In die Berechnung von S_2 können neben k_a weitere Faktoren eingehen. Beispielsweise kann eine Standardisierung gegen experimentelle Schwankungen, die beginnend mit der Inkubation von Sample und Array auftreten können, mit Hilfe von über die Fläche des Arrays verteilten Array-Elementen vorgenommen werden, auf denen wie vorstehend beschriebene Kontrollsonden angeordnet ist. Derartige Array-Elemente werden im folgenden auch als Kontroll-Elemente bezeichnet. Im Fall von Oligonukleotidsonden als Sondenmolekülen wird beispielsweise nach Hybridisierung mit dem eine zur Kontroll-Oligonukleotidsonde komplementäre Sequenz aufweisenden Target, der Spaltung der labilen Bindung und gegebenenfalls nach Waschschritten, die Signalintensität an diesen Kontroll-Elementen ermittelt und gegebenenfalls durch mathematische Verknüpfung mit k_a normalisiert.

Die gegebenenfalls durch mathematische Verknüpfung mit k_a normalisierten Signalintensitäten sollten für alle Kontroll-Elemente gleich sein. Bei starken Abweichungen wird ein Korrekturfaktor k_e für jedes Array-Element berechnet, der eine Normalisierung gegen experimentelle Schwankungen, die zu unterschiedlich hellen Regionen auf dem Array führen erlaubt. Der Korrekturfaktor k_e wird aus der Abweichung der gegebenenfalls durch mathematische Verknüpfung mit k_a normalisierten Signalintensitäten der zu einem Array-Element benachbarten Kontroll-Elemente unter Berücksichtigung des Abstandes zwischen Array-Element und Kontroll-Element errechnet. Vorzugsweise wird der Korrekturfaktor nach dem in Selinger D.W., Cheung K.J., Mei R., Johansson E.M., Richmond C.S., Blattner F.R., Lockhart D.J., Church G.M., Nat Biotechnol. 2000 Dec;18(12): auf Seite 1267 beschriebenen Algorithmus berechnet.

Vorzugsweise ergibt sich S_2 aus S_1 durch mathematische Verknüpfung mit k_a und k_e . Alternativ ergibt sich S_2 aus S_1 durch mathematische Verknüpfung mit k_e .

Bei einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens erfolgt die Normierung somit durch mathematische Verknüpfung der in Schritt h) erhaltenen Signalintensitäten mit einem anhand der Signalintensitäten bei der Qualitätsprüfung ermittelten Korrekturfaktor und/oder einem durch anhand der Signalintensitäten von Kontroll-Elementen ermittelten Korrekturfaktor.

Eine weitere Ausführungsform der standardisierten Auswertung stellt die Korrektur gegen das Hintergrundsignal dar. Dazu finden Array-Elemente Verwendung, auf denen Sonden angeordnet sind, die keine bzw. keine detektierbare Wechselwirkung mit Targets aus dem Sample eingehen. Diese Array-Elemente werden im folgenden auch als sog. Hintergrund-Elemente bezeichnet. Nach Hybridisierung, Spaltung der labilen Bindung und gegebenenfalls nach Waschschritten, wird die Signalintensität dieser Hintergrund-Elemente gemessen,

gegebenenfalls durch mathematische Verknüpfung mit k_a und/oder k_e normalisiert und von den Signalintensitäten aller Array-Elemente subtrahiert.

Vorzugsweise wird die Signalintensität der Hintergrundelemente von S_1 subtrahiert. Es ergibt sich S_1' , welches nach einer der vorstehend beschriebenen Ausführungsformen mit k_a , k_e oder k_a) und k_e korrigiert werden kann, so daß sich die korrigierte Signalintensität S_2' ergibt.


Ebenfalls bevorzugt ergibt sich die korrigierte Signalintensität S_2' , indem die Signalintensität der Hintergrundelemente von S_2 subtrahiert wird.

Bei einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens erfolgt die Normierung somit durch Subtraktion der in Schritt h) erhaltenen und gegebenenfalls wie vorstehend beschrieben korrigierten Signalintensitäten mit von Hintergrund-Elementen detektierten Signalintensitäten.


Insbesondere bei quantitativen Analysen ist eine Normalisierung der Ergebnisse in Bezug auf die Kennlinie des Assays, d.h. die Abhängigkeit der Signalintensität von der Menge der vorhandenen detektierbaren Einheiten vorteilhaft. Für diese Normalisierung werden Sonden-Arrays verwendet, bei denen auf mindestens einem, vorzugsweise mehreren Array-Elementen markierte, jedoch nicht mit einer selektiv spaltbaren Bindung versehene Sonden angeordnet sind, die vorzugsweise sich in charakteristischer Weise in ihrem Markierungsgrad unterscheiden, beispielsweise, indem sie mit einem definierten, in Form einer Verdünnungsreihe von Array-Element zu Array-Element variierenden Gemisch aus markierten und unmarkierten Sonden versehen wurden. Derartige Array-Elemente werden im folgenden als Detektionsstandard-Elemente bezeichnet.

Vorzugsweise erfolgt somit eine Normierung des Nachweises durch Vergleich der für ein Array-Element erhaltenen Signalintensität mit Signalintensitäten von Arrayelementen, auf

denen nicht mit einer selektiv spaltbaren Bindung versehene Oligonukleotidsonden und/oder direkt mit der Array-Oberfläche gekoppelte detektierbare Einheiten angeordnet sind.



Nach Abschluß eines derartigen Experiments werden die Signalintensitäten der entsprechenden Detektionsstandard-Elemente ermittelt und gegebenenfalls durch Abzug des Hintergrundsignals und Korrektur mit den vorstehend beschriebenen Korrekturfaktoren normalisiert. Die gegebenenfalls normalisierten Werte der Detektionsstandard-Elemente werden gegen das Mischungsverhältnis von markierter und unmarkierter Substanz aufgetragen. Es entsteht eine Eichkurve, die den dynamischen Bereich und die Art der Abhängigkeit der Signalintensität von der Menge an detektierbaren Einheiten, die sog. Kennlinie des Arrays.



Die Kennlinie kann einerseits dazu verwendet werden, nicht quantifizierbare Werte, die außerhalb des dynamischen Bereiches liegen, zu identifizieren und gegebenenfalls von der Analyse auszuschließen. Andererseits kann allen anderen Signalintensitäten eine bestimmte Menge an detektierbaren Einheiten zugeordnet werden. Dadurch ist die Möglichkeit einer quantitativen Analyse sowie der Vergleich von Experimenten, die mit unterschiedlichen Arrays durchgeführt wurden, gegeben.

Von den vorstehend beschriebenen Methoden der Normierung und Standardisierung können je nach Bedarf Methoden ausgewählt werden und einzeln oder in beliebigen Kombinationen durchgeführt werden.

Somit handelt es sich bei dem erfindungsgemäßen Verfahren nicht nur um ein Verfahren zum Nachweis von Wechselwirkungen auf Sonden-Arrays, bei dem auf die Markierung von Targetmolekülen verzichtet werden kann, sondern vielmehr um ein Verfahren, bestehend aus Verfahrensschritten zur Herstellung und Qualitätsüberwachung von Sonden-Arrays, die für einen derartigen Nachweis geeignet sind, aus Verfahrensschritten zur Verwendung dieses

Arrays in Assays, sowie aus Verfahrensschritten zur Auswertung und Normierung der Ergebnisse.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform findet die Inkubation des Sonden-Array mit einem Sample bestehend aus unmarkierten Targets statt. Für spezielle Anwendungen, beispielsweise zum Zweck der Eichung von klassischen Detektionsmethoden gegen das erfindungsgemäße Verfahren, kann auch ein markiertes Targetgemisch Verwendung finden.

Gegebenenfalls werden die unmarkierten Targets vor der Inkubation mit dem Sonden-Array durch ein geeignetes enzymatisches, physikalisches und/oder chemisches Verfahren fragmentiert.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Wechselwirkung zwischen dem Target und der Sonde eine Hybridisierung zwischen zwei Nukleotidsequenzen. Die Hybridisierung der Targets mit den auf einem Sonden-Array angeordneten Sonden findet nach einem der bekannten Standardprotokolle statt (siehe u.a. Lottspeich und Zorbas, 1998). Beispielsweise erfolgt die Inkubation von Sample und Array in einem wässrigen oder Formamid-haltigen Hybridisierungspuffer. Vorzugsweise werden SSC-, SSPE- oder Phosphatpuffer-basierte wässrige Hybridisierungspuffer verwendet, die besonders bevorzugt Natriumchlorid bzw. Natriumnitrat enthalten.

Die entstandenen Hybride können durch kovalente Bindung, beispielsweise über Psoralen-Interkalation und nachfolgendes "Cross-Linking", oder wie in US 4,599,303 beschrieben, durch nichtkovalente Bindung, beispielsweise durch Bindung von Interkalatoren, stabilisiert werden.

Im Anschluß an die Hybridisierung der Targets mit den auf einem Sonden-Array angeordneten markierten Sonden erfolgt üblicherweise ein Waschschriff, mit dem unspezifisch und dadurch schwächer gebundene Komponenten entfernt werden.

Da bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die Targets keine Markierung aufweisen, kann alternativ auf einen Waschschriff verzichtet werden, da unspezifisch gebundene Targets den gespaltenen Sonden-/Target-Komplex nicht stabilisieren. Der gegebenenfalls notwendige Waschschriff nach der Wechselwirkung von Array und Target kann ebenfalls in einem dem Fachmann geläufigen SSC-, SSPE-, Phosphat-basierten oder anderen geeigneten Puffersystem unter Bedingungen erfolgen, die unspezifische Wechselwirkungen destabilisieren, während spezifische Wechselwirkungen relativ unbeeinflußt bleiben.

Alternativ ist die Wechselwirkung zwischen dem Target und der Sonde eine Reaktion zwischen einer Antigenstruktur und dem entsprechenden Antikörper oder einem hypervariablen Abschnitt davon oder eine Reaktion zwischen einem Rezeptor und einem entsprechenden Liganden. Falls das Sondenmolekül ein Polypeptid ist, bietet sich für die Bereitstellung einer selektiv spaltbaren Bindung die selektive Modifizierung einer Amidbindung an.

Die Wechselwirkung der Targets mit den Sonden bzw. die Bindung oder Erkennung der Targets durch spezifische Sonden ist üblicherweise ein spontane nicht-kovalente Reaktion unter optimalen Bedingungen. Davon umfaßt sind ebenfalls nicht-kovalente chemische Bindungen. Die Zusammensetzung des Mediums sowie weitere chemische und physikalische Faktoren beeinflussen die Geschwindigkeit und Stärke der Bindung. So erniedrigt beispielsweise bei der Nukleinsäure-Erkennung eine höhere Stringenz die Kinetik und Stärke der Bindung zwischen zwei nicht perfekt komplementären Strängen. Die Optimierung der Bindungsbedingungen ist für Antigen/Antikörper- oder Ligand/Rezeptor-Wechselwirkungen ebenfalls erforderlich, die Bindungsbedingungen sind aber üblicherweise weniger spezifisch.

Die Spaltung der labilen Bindung findet bei dem erfindungsgemäßen Verfahren unter Bedingungen statt, bei der sowohl das ungespaltene Hybrid, als auch das nach Spaltung vorliegende, aufgrund des Einzelstrangbruches weniger stabile Hybrid erhalten bleiben. Solche Bedingungen werden insbesondere durch eine hohe Ionenstärke und/oder eine niedrige Temperatur bereitgestellt.

Vorzugsweise wird die selektiv spaltbare Bindung durch chemische und/oder physikalische Methoden selektiv gespalten, besonders bevorzugt durch Zugabe von Ionen, beispielsweise Säureanionen, Basekationen, Fluorid- und/oder Schwermetallionen wie Quecksilber- und/oder Silberionen

Handelt es sich bei der zu spaltenden Bindung um eine zwei Nukleoside verbrückende Phosphthioat-Bindung, kann diese Bindung durch oxidativen Angriff mit Jod bzw. durch Schwermetallionen wie Silberionen bzw. Quecksilberionen gespalten werden. Bevorzugt erfolgt die Spaltung der Bindung mit Silberionen, besonders bevorzugt mit Silbernitrat. Die zur Spaltung eingesetzte Lösung weist vorzugsweise eine hohe Ionenkonzentration zur Stabilisierung der Hybride auf.

Die zur Stabilisierung der Hybride erforderliche Ionenstärke wird vorzugsweise durch Salze erreicht, die mit Silberionen keine schwerlöslichen Salze bilden. Besonders bevorzugt wird Natriumnitrat. Die Endkonzentration an Salz zur Erhöhung der Ionenstärke, insbesondere an Natriumnitrat, im Spaltungspuffer beträgt von einer gesättigten Lösung bis 10 mM, bevorzugt von 100 mM bis 2 M und besonders bevorzugt von 500 mM bis 1M.

Die Spaltungsreaktion findet bei vorzugsweise bei Temperaturen von -70°C bis 100°C , besonders bevorzugt von -20°C bis 50°C , and am meisten bevorzugt von 0°C bis 20°C statt.

Die Konzentration an Silbernitrat in der Spaltungslösung reicht insbesondere von einer gesättigten Lösung bis zu 1 μ M. Vorzugsweise wird eine Silbernitrat-Lösung mit einer Konzentration zwischen 1 M und 5 mM, besonders bevorzugt zwischen 10 und 50 mM verwendet.

Handelt es sich bei der zu spaltenden Bindung um ein verbrücktes Phosphthioat und wird diese Bindung mit Silberionen gespalten, sind vorzugsweise vor der Spaltungsreaktion Ionen, die mit Silber ein schwerlösliches Produkt bilden, zu entfernen. Dies erfolgt beispielsweise durch Waschen mit einem Puffer, der solche Ionen nicht enthält, bevorzugt durch Waschen mit 5 M bis 10 mM Natriumnitrat, besonders bevorzugt durch Waschen mit 1 M Natriumnitrat.

Bei einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens kann der Schritt g), d.h. der Waschschrift, um nicht durch eine Wechselwirkung mit Targetmolekülen an der Array-Oberfläche zurückgehaltene markierte Sondenmolekül-Fragmente zu entfernen, weggelassen werden. Voraussetzung für einen derartigen homogenen Assay ohne entsprechendes Waschen ist der Einsatz von geeigneten, dem Fachmann bekannten Meßmethoden, wie z.B. der Fluoreszenz-Polarisationsmessung, die eine klare Unterscheidung des Signals gebundener und ungebundener Marker gestatten. Eine weitere Alternative bei der Durchführung eines derartigen Assays ohne den Waschschrift g) ist die Verwendung konfokaler optischer Aufbauten, die ausschließlich das Signal auf der Oberfläche erfassen.

Das erfindungsgemäße am Beispiel von Sonden-Arrays beschriebene Nachweisverfahren kann selbstverständlich auch auf andere, nicht Array-basierte Verfahren angewendet werden, bei denen die vorstehend beschriebenen Sondenmoleküle, umfassend mindestens eine Markierung sowie mindestens eine selektiv spaltbare Bindung, zum Einsatz gelangen.

Im folgenden ist eine Anwendung des erfindungsgemäßen Nachweisprinzips auf Mikrotiterplattenassays und Assays in Reaktionsgefäßen, sog. Tube-Assays, beschrieben. Die Immobilisierung und Synthese der vorstehend beschriebenen Sondenmoleküle auf dem jeweiligen Trägersystem erfolgt analog dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren der Sonden-Arrays. Eventuelle Unterschiede in der Vorgehensweise, die sich durch die Verwendung z.B. von Mikrotiterplatten oder Reaktionsgefäßen anstelle von Array-Substraten ergeben, sind dem Fachmann ohne weiteres geläufig.

Der Einsatz von auf der Mikrotiterplatte bzw. am Gefäßboden bzw. an der Gefäßwand immobilisierten Sonden mit selektiv spaltbaren Bindungen bzw. Einheiten in Mikrotiterplatten und Reaktionsgefäßen läßt sich in zwei Ausführungsformen unterteilen.

Zum einen kann der Nachweis der Wechselwirkung einer Sonde, die wie vorstehend beschrieben z.B. mit einem Farbstoff, einem Goldpartikel, einem Latexkügelchen und dergleichen markiert ist, mit einem Target analog der vorstehend am Beispiel für Sonden-Arrays beschriebenen Vorgehensweise durch Detektion der nach der Spaltungsreaktion verbliebenen Marker an der Oberfläche des Gefäßes erfolgen.

Bei dieser Ausführungsform kann beispielsweise der Nachweis nach erfolgter Wäsche durch Messung des Marker-spezifischen Signals, z.B. Fluoreszenz bei einem entsprechenden Farbstoff, erfolgen. Ein homogener Assay ohne entsprechendes Waschen ist ebenfalls möglich. Voraussetzung hierfür ist der Einsatz von geeigneten Meßmethoden, wie z.B. der Fluoreszenz-Polarisationsmessung, die eine klare Unterscheidung des Signals gebundener und ungebundener Marker gestatten. Eine weitere Alternative bei der Durchführung eines derartigen Assays ist die Verwendung konfokaler optischer Aufbauten, die ausschließlich das Signal auf der Oberfläche erfassen. Eine Reihe von markerspezifischen Verfahren ist im Stand der Technik bereits gewürdigt und könnte in Analogie zu den Array-basierten Assays auch Einsatz in Mikrotiterplatten- oder Gefäß-basierten Assays finden.

Zum anderen kann der Nachweis der Wechselwirkung einer Sonde mit einem Target durch Detektion der nach der Spaltungsreaktion in Lösung befindlichen Marker erfolgen. Bei dieser Ausführungsform liefert der Nachweis in Lösung ein targetspezifisches Signal, wenn im Gefäß lediglich ein Target untersucht werden soll bzw. die unterschiedlichen zu untersuchenden Targets mit jeweils unterschiedlich markierten Sonden nachgewiesen werden, zum Beispiel bei Verwendung von vier Farbstoffen für vier Sonden.

Der Nachweis in Lösung bietet den Vorteil, mit sehr einfachen Aufbauten eine empfindliche Messung gewährleisten zu können und ist vor allem dann sinnvoll, wenn davon ausgegangen werden kann, daß die Unterschiede in der Bindung von Targets gegen die Oberfläche nur minimal sind, so daß eine vergleichende Messung des immobilisierten Signals ein starkes positives Signal liefern würde und die minimalen Veränderungen des Signals nicht signifikant ins Gewicht fallen. Homogene Assays lassen sich auf diese Weise ebenfalls realisieren, wenn ein Detektionsverfahren gewählt wird, das die Diskriminierung zwischen gebundenem und ungebundenem Signal gestattet, bspw. wären dies konfokale Korrelationsspektroskopie oder Fluoreszenz-Polarisationsmessungen.

Der Verzicht auf die Markierung des Targets und die Möglichkeit der Durchführung homogener Assays sind wesentliche Vorteile der Methode und sprechen auch für deren Einsatz z.B. bei Assays auf Mikrotiterplatten und in Reaktionsgefäßen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von Targets aus einer Probe durch molekulare Wechselwirkungen zwischen Sonden und Targets auf Sonden-Arrays, umfassend die folgenden Bestandteile:

- a) ein erfindungsgemäßes Sonden-Array;

- b) Reagenzien für die selektive Spaltung der selektiv spaltbaren Bindung in den Sonden;
- c) Hybridisierungspuffer; und
- d) ggf. Waschpulver.

Vorzugsweise werden die Reagenzien ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Schwermetallionen, z.B. Quecksilber- und/oder Silberionen.

Bei bevorzugten Ausführungsformen des Kits umfaßt das erfindungsgemäße Sonden-Array zusätzlich eine Reaktionskammer und/oder eine Detektionsvorrichtung und/oder eine Temperatursteuerungseinheit und/oder eine Lichtquelle.

Die Detektionsvorrichtung wird vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Fluoreszenzmikroskop, einem Laserscanner für Arrays, einem Mikroskop und einem CCD-basierten Scanner und zeichnet üblicherweise den gesamten Bereich des Sonden-Arrays auf.

Eine Lichtquelle wird vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Laser, Laserdioden und einer Weißlichtquelle mit entsprechendem Filter.

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform liegen der Sonden-Array und eine Reaktionskammer und/oder eine Detektionsvorrichtung und/oder eine Temperatursteuerungseinheit und/oder eine Lichtquelle als hochintegrierte autonome Einheit vor.

Das erfindungsgemäße Sonden-Array bzw. das erfindungsgemäße Nachweis-Verfahren bzw. der erfindungsgemäße Kit kann zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von Targets aus einer Probe durch molekulare Wechselwirkungen zwischen Sonden und Targets,

insbesondere zur Untersuchung des genotypischen Zustands und/oder des physiologischen Zustands von Zellen verwendet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird ein Sonden-Array bereitgestellt, bei dem Oligonukleotide ortsspezifisch immobilisiert bzw. synthetisiert werden, die entgegengesetzt zur Immobilisierungsposition eine Markierung tragen. Zwischen der Immobilisierungs- und der Markierungsposition befindet sich vorzugsweise etwa in der Mitte eine labile Bindung, z.B. eine verbrückte Phosphothioat-Bindung.

Das erfindungsgemäße Sonden-Array wird unter Bedingungen, die eine spezifische Wechselwirkung, z.B. eine Hybridisierung, erlauben, mit einem Sample inkubiert. Targets mit Affinität zu den Sonden des Sonden-Arrays werden an diese binden. Gegebenenfalls erfolgen Schritte zum Entfernen der unspezifisch gebundenen Targets. Vorzugsweise wird die Verteilung der Markierungen auf der Oberfläche zur Überprüfung der Qualität des hergestellten Sonden-Arrays mit einem bildgebenden Verfahren dokumentiert. Anschließend wird die labile Bindung, z.B. durch Zugabe von Silberionen, geschnitten. Dies erfolgt unter Bedingungen, bei denen die spezifische Wechselwirkung zwischen Target und Sonde hinreichend stabil ist, um zu gewährleisten, daß die Markierung auch nach der Spaltung durch die Wechselwirkung zwischen Target und Sonde erhalten bleibt. Sonden, an denen keine spezifische oder gar keine Wechselwirkung mit Targets erfolgte, werden durch die Spaltung ihre Markierung verlieren. Das Ergebnis der Umsetzung wird vorzugsweise durch ein bildgebendes Verfahren dokumentiert. Aus der Markierungsintensität der einzelnen Sonden nach der Bindungsspaltung kann die An- bzw. Abwesenheit von Targets in der Probe abgeleitet werden.

Dadurch daß eine Markierung der Targetmoleküle nicht mehr erforderlich ist, können mittels des erfindungsgemäßen Sonden-Arrays erhebliche Einsparungen von Zeit und Kosten ermöglicht werden. Ferner ist die Markierung nicht mehr von der Beschaffenheit der nicht

bekannten Targetmoleküle abhängig, so daß die Nachweisergebnisse vergleichbar werden. Ein weiterer Vorteil ist, daß die Markierung der Sonden auf dem Sonden-Array gut standardisierbar ist, insbesondere auch automatisierbar ist. Die markierten Sonden stellen ferner gleichzeitig eine Qualitätskontrolle für die Synthese und Immobilisierung der Sonden auf dem Sonden-Array dar. Schließlich ist durch eine Markierung von Sonden anstelle von Targets auch eine Standardisierung der Bildauswertung gewährleistet.



Die folgenden Beispiele und Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung und sollen in nicht einschränkender Weise ausgelegt werden.

Beispiele

Beispiel 1:

Synthese von 5'-S-(Dimethoxytrityl)-mercapto-5'-deoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphit)



Die Synthese des Phosphoramidit-Bausteins erfolgt in fünf Schritten nach dem folgenden Syntheschema (siehe auch Abbildung 1):

Thymidin wird in Pyridin suspendiert und auf 0°C gekühlt. Über einen Zeitraum von 30 min wird eine Lösung von p-Toluolsulfonsäurechlorid in Pyridin zugetropft und die Lösung über Nacht bei 4°C gerührt. Die Lösung wird in Eiswasser eingegossen und der entstandene Niederschlag wird abgesaugt, anschließend in Dichlormethan gelöst und 2 mal mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung und 1 mal mit gesättigter Natriumchlorid Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Die Ausbeute beträgt 68%.

5'-O-(p-Tolylsulfonyl)-thymidin und Kaliumthioacetat werden in Aceton suspendiert und für 3 h unter Argon-Atmosphäre auf 50°C erwärmt. Die Suspension rührt anschließend 16 h bei RT. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit wenig Aceton nachgewaschen. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer einrotiert und der Rückstand anschließend durch Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel Dichlormethan:Methanol 9:1). Die Ausbeute beträgt 58%.



5'-S-(Acetyl)-thymidin wird in Methanol gelöst und 5 molare methanolische Salzsäure zugeben, so daß die Endkonzentration an Säure 1 molar ist. Die Lösung wird unter Argon-Atmosphäre auf 45°C erwärmt und für 2 h gerührt. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer auf etwa die Hälfte reduziert und zu einer Lösung aus DMTr-Cl in Essigsäure und Wasser gegeben. Die Lösung wird für 3 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend ebenfalls auf die Hälfte am Rotationsverdampfer reduziert. Die Lösung wird mit Wasser verdünnt und mit 2 molarer Natronlauge auf pH 10 eingestellt. Dichlormethan wird zugegeben und 2 mal mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat Lösung und 1 mal mit gesättigter Natriumchlorid Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert, der Rückstand wird durch Säulenchromatographie gereinigt (Laufmittel Dichlormethan:Methanol 97:3). Die Ausbeute an 5'-S-(Dimethoxytrityl)-thymidin beträgt 68%.



Zu einer Lösung von 5'-S-(Dimethoxytrityl)-thymidin in Dichlormethan:Acetonitril wird unter Argon-Atmosphäre Tetrazol zugegeben und anschließend Phosphorigsäure-bis-(diisopropylamid)-2-cyanethylester langsam zugetropft. Nach 2 h Stunde wird die Reaktion durch Zugabe von n-Butanol gequencht. Die Lösung wird mit Essigsäureethylester verdünnt und 2 mal mit 5%iger Natriumhydrogencarbonat Lösung und 1 × mit gesättigter Natriumchlorid Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert.

Der Rückstand wird in wenig Dichlormethan:Diethylether aufgenommen und in kaltes n-Pentan einpipettiert. Die Ausbeute an 5'-S-(Dimethoxytrityl)-mercapto-5'-deoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphit) beträgt 93%.

Das hergestellte Amidit wird anschließend in ein Modelloligonukleotid (24 mer, siehe Beispiel 2) eingebaut.



a) Charakterisierung der hergestellten Verbindungen

5'-O-(p-Tolylsulfonyl)-thymidin ($C_{17}H_{20}N_2O_7S$)

ESI(+)-MS berechnete Masse: 396.42 g/mol

 gefundene Masse: 397.1 g/mol

Schmelzpunkt 168-169°C

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 9:1 0.39

1H -NMR DMSO

1.75 (s, 3H, CH_3 -T); 2.10 (m, 2H, 2',2''-H); 2.40 (s, 3H, CH_3 -tosyl);
3.85 (m, 1H, 4'-H); 4.21 (m, 3H, 5',5''-H, 3'-H); 5.57 (d, 1H, 3'-OH);
6.14 (t, 1H, 1'-H); 7.36 (d, 1H, 6-H); 7.44 (d, 2H, AA'BB'); 7.82 (d,
2H, AA'BB'); 11.31 (s, 1H, NH)




5'-S-Acetyl-thymidin ($C_{12}H_{16}N_2O_5S$)

ESI(+)-MS berechnete Masse: 300.33 g/mol

 gefundene Masse: 301.2 g/mol

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 9:1 0.37

¹H-NMR DMSO
1.81 (s, 3H, CH₃-T); 2.07 (m, 1H, 2'-H); 2.23 (m, 1H, 2''-H); 2.37 (s, 3H, O-Ac); 3.1 (m, 1H, 5'-H); 3.23 (m, 1H, 5''-H); 3.75 (m, 1H, 4'-H); 4.1 (m, 1H, 3'-H); 5.41 (d, 1H, 3'-OH); 6.15 (t, 1H, 1'-H); 7.45 (d, 1H, 6-H); 11.03 (s, 1H, NH)


 5'-S-(Dimethoxytrityl)-thymidin (C₃₁H₃₂N₂O₆S)

ESI(-)-MS berechnete Masse: 560.7 g/mol

gefundene Masse: 560.2 g/mol

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 9:1 0.51

¹H-NMR CDCl₃
1.86 (s, 3H, CH₃-T); 2.06 (m, 1H, 2'-H); 2.29 (m, 1H, 2''-H); 2.5 (m, 1H, 5'-H); 2.54 (m, 1H, 5''-H); 3.78 (m, 7H, 4'-H, OCH₃); 4.1 (m, 1H, 3'-H); 6.16 (t, 1H, 1'-H); 6.83 (m, 5H, 6-H, aromatisch); 7.22-7.43 (m, 9H, aromatisch)

 5'-S-(Dimethoxytrityl)-mercapto-5'-deoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl,N,N'-diisopropylphosphit) (C₄₀H₄₉N₄O₇PS)

ESI(+)-MS berechnete Masse: 760.86 g/mol


gefundene Masse: 761.2 g/mol

Rf-Wert Dichlormethan:Methanol 9:1 0.65

³¹P-NMR CDCl₃ + 0.1% DIPEA
149.55, 149.35


Beispiel 2:

Synthese eines Modelloligonukleotids 5'-AGC CCT TAC TT GAC GGT ATA TCT-3'




Die Synthese des Oligonukleotides verläuft nach der Phosphodiester-Methode. Die Kupplungen der unmodifizierten Bausteine finden nach dem Standardprotokoll an einem DNA Synthesizer (Perseptive Biosystem bzw. Applied Biosystem, Weiterstadt, Deutschland) statt. Der modifizierte Baustein (unterstrichen) wird an einem DNA-Synthesizer (Applied Biosystem) nach einem modifizierten Syntheseprotokoll gekoppelt. Die weitere Synthese findet ebenfalls an einem DNA Synthesizer (Perseptive Biosystem) statt.

Die Kupplung des modifizierten Bausteins erfolgt hier durch die zweimalige Zugabe des Amidites und Tetrazol zur Säule (Double-Couple-Verfahren) und der Verlängerung der Kupplungszeit auf 300 s. Das anschließende Capping und die Oxidation erfolgen unter Standardbedingungen. Die Abspaltungszeit für die Detritylierung muß auf die fünffache Zeit verlängert werden und an die Detritylierung schließt sich direkt die Spülung der Säule mit einer DTT-Lösung an (220 mM DTT (1,4-Dithiothreitol)) in einer Lösung aus THF/Pyridin/Wasser 7/1/2). Die Spülung mit DTT-Lösung erfolgt nach folgendem Protokoll:


- 
- a. 30 s DTT-Lösung zur Säule gegeben
 - b. 30 s Wait-Schritt
 - c. 30 s DTT-Lösung zur Säule gegeben
 - d. 150 s Wait-Schritt
 - e. 30 s DTT-Lösung zur Säule gegeben
 - f. 150 s Wait-Schritt
 - g. 30 s DTT-Lösung zur Säule gegeben
 - h. 150 s Wait-Schritt
 - i. 30 s DTT-Lösung zur Säule gegeben
 - j. 150 s Wait-Schritt

k. 30 s DTT-Lösung zur Säule gegeben

Die DTT-Lösung wird mit einem Waschschrift von der Säule gespült, der dem Standardprotokoll nach der Jod-Oxidation entspricht. Allerdings wurden hier die Wasch- und Spülschritte verdoppelt. Die weitere Synthese nach dem Einbau des modifizierten Bausteins erfolgt unter Standardbedingungen. Der Synthesemaßstab beträgt 1 μmol .



Das Oligonukleotid wird mit Ammoniak über Nacht behandelt. Was zur Abspaltung des Oligonukleotides von der festen Phase und der Entschützung der Basenschutzgruppen führt. Für die anschließende Reinigung wird die Ammoniak Lösung direkt auf eine R3-HPLC-Säule (Perseptive Biosystem) eingespritzt (Gradient 0-25% Puffer B in 10 min, Puffer A 0.1 molar TEAA-Lösung; Puffer B ACN). Die Produktfraktionen werden aufgefangen und das Lösungsmittel abgezogen und das Oligonukleotid wird anschließend als Natrium-Salz durch eine Ethanol-Fällung ausgefällt. Es schließt sich eine O.D-Bestimmung des getrockneten Präzipitates an. Als Analytik dienen die HPL-Chromatographie, Gelelektrophorese und eine MALDI-MS Untersuchung.




Um die später durchzuführende Spaltung nachweisen zu können, werden als weitere Oligonukleotide die entstehenden Spaltungsbruchstücke und eine Kontrolle (unmodifiziertes Modellsequenz) synthetisiert. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt an dem Perseptive Biosystem-Synthesizer nach dem Standardprotokoll für eine 1 μmol -Synthese. Es erfolgt die Abspaltung und Entschützung mit Ammoniak über Nacht und die anschließende Reinigung über HPL-Chromatographie. Die Oligonukleotide werden als Na-Salz gefällt und ebenfalls analytisch durch HPL-Chromatographie, Gelelektrophorese und MALDI-MS untersucht. Und dienen als Kontrollen für die folgenden Spaltungsexperimente.

Beispiel 3:

Spaltung des Modelloligonukleotides


Die Spaltung des Modelloligonukleotides erfolgt durch die Zugabe von Silbernitrat. Das Experiment gestaltet sich wie folgt:



1 O.D. des Modelloligonukleotides wird mit 15 µl einer 50 mM Silbernitrat-Lösung versetzt und die Lösung steht für 1 h bei Raumtemperatur. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 4 µl einer 220 mM DTT Lösung gequencht. Nach 1 h wird die Probe zentrifugiert und die Lösung abgenommen. Als Analytik schließt sich eine HPL-Chromatographie und eine Gelelektrophorese (15% TBE/Urea-Gel, 1,0 mm x 15 well, 250 V, 90 min) an. Die bei der Spaltung entstehenden Bruchstücke

5'-AGC CCT TAC T-3' (10 mer)

5'-HO-TT GAC GGT ATA TCT-3' (14 mer)



sowie das unmodifizierte Oligonukleotid

5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3'

dienen als Kontrollen.

Die HPL-Chromatogramme an einer Beckmann HPLC-Anlage (Gold-System) aufgenommen.

Folgende Puffer wurden verwendet:

Puffer A	Acetonitril	400 ml
----------	-------------	--------

	Wasser	1600 ml
	NaH ₂ PO ₄ ×2H ₂ O	3.12 g
Puffer B	Acetonitril	400 ml
	Wasser	1600 ml
	NaH ₂ PO ₄ ×2H ₂ O	3.12 g
	NaCl	175.32 g

Folgender Gradient auf der Ionenaustauscher-Säule (Waters) wurde verwendet:

0 min. 5% Puffer B

40 min 60 % Puffer B

Die Retentionszeiten der Oligonukleotide sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

5'-TTG ACG GTA TAT CT-3'	24.26 min
5'- AGC CCT TAC T-3'	23.22 min
5'-AGC CCT TAC T <u>T</u> GAC GGT ATA TCT-3'	28.42 min
Durchgeführte Spaltungsreaktion	23.49 min; 24.65 min

Das HPL-Chromatogramm und das Gelbild zeigen (siehe Abbildung 2), daß die Spaltung des modifizierten Oligonukleotides quantitativ verläuft. Nach der Spaltungsreaktion können nur

noch das 10-mer und das 14-mer detektiert werden. Es kann kein modifiziertes Oligonukleotid detektiert werden, während daß unmodifizierte Oligonukleotid nicht geschnitten wird und detektiert werden kann. Weitere Experimente zeigen, daß die Spaltung mit einer 10 mM Silbernitrat-Lösung innerhalb von 5 min. quantitativ verläuft.

Als weitere analytische Methode wurde eine Messung an einem Biacore-Gerät (Uppsala, Schweden) durchgeführt, um aufzuzeigen, daß die Spaltung auch an einer festen Phase möglich ist. Für diese Messungen wurde das folgende Oligonukleotid synthetisiert:

5'-Biotin-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3'

Das 5'-Ende des Oligonukleotides wurde mit Biotin (Firma Glen Research, Sterling, Virginia, USA) modifiziert. Die Synthese des Oligonukleotides erfolgt wie in Beispiel 5 beschrieben. Die weitere Modifikation am 5'-Ende wurde an einem Applied Biosystem 394-Synthesizer durchgeführt. Für die Synthese wurde ein Standardzyklus verwendet, dessen Kupplungszeit auf 300 s verlängert wurde. Die Aufreinigung und Aufarbeitung erfolgt ebenfalls wie in Beispiel 2 beschrieben. Es wurden für die Messungen weiterhin drei Oligonukleotide hergestellt, die unterschiedlich komplementäre Bereiche mit dem modifizierten Modelloligonukleotid aufweisen. Dabei handelt es sich um die folgenden drei Verbindungen, die nach Standardbedingungen synthetisiert und aufgereinigt wurden.

1. 5'-GCA GCT AGA TAT ACC GTC AA-3'
2. 5'-GCT AGA TAT ACC GTC AAA GT-3'
3. 5'-GAT ATA CCG TCA AAG TAA GG-3'

5'-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3'

3'-AA CTG CCA TAT AGA TCG ACG-5' (1.)

3'-TG AAA CTG CCA TAT AGA TCG-5' (2.)

3'-GGA ATG AAA CTG CCA TAT AG-3'

(3.)

Für die Messungen am Biacore Gerät mußte zuerst ein Streptavidin-Chip hergestellt werden. Dafür wurde ein CM 5-Chip der Firma Biacore verwendet, der entsprechend modifiziert wurde. Der CM 5-Chip enthält auf der Oberfläche als funktionelle Gruppe die Carboxyl-Gruppe, die mit EDC/NHS aktiviert wird und anschließend mit einem Streptavidin-Derivat, das eine Amino-Gruppe aufweist, umgesetzt wird. Das biotinylierte Oligonukleotid wird durch die Zugabe von 25 µl einer 50 µmolaren Lösung an den Chip gebunden. Nach Anbindung des biotinylierten Modelloligonukleotides, wird das entsprechend komplementäre Oligonukleotid (1. bis 3.) gebunden, indem eine 500 mM Lösung für 5 min. zugeben wird (25µl Lösung). Die anschließende Spaltung mit einer 10 mM Silbernitrat-Lösung erfolgt innerhalb von 6 min. durch die Zugabe von 30 µl Lösung. Es folgt eine Spülung mit einer 0,5 molaren EDTA-Lösung an. Die anschließende Detektion zeigt eine vollständige Spaltung, auf dem Chip kann nur noch das entsprechende nicht abspaltbare 10mer detektiert werden.

Beispiel 4:

Synthese von Oligonukleotidsonden für die Verwendung auf einem Sonden-Array

Für die Anbindung an einen Chip wurden die folgenden Oligonukleotide synthetisiert:

5'-Amino-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3'

5'-Amino-AGC CCT TAC TTT GAC GGT ATA TCT-3' (Kontrollsequenz)

Die 5'-Enden der Oligonukleotide wurden mit einem Amino-Link modifiziert (Firma Glen Research). Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt wie in Beispiel 2 beschrieben. Die weitere Modifikation am 5'-Ende wurde am Applied Biosystem 394 Synthesizer durchgeführt.

Für die Synthese wurde ein Standardzyklus verwendet, dessen Kupplungszeit auf 300 s verlängert wurde. Die Aufreinigung und Aufarbeitung erfolgt ebenfalls wie in Beispiel 2 beschrieben.

Beispiel 5:

Vergleich der Hybridisierungseigenschaften eines Oligonukleotids mit einer verbrückten Phosphothioat-Bindung mit einem unmodifizierten Oligonukleotid

Auf einer epoxidierten Pyrex-Glasoberfläche wurden zwei Oligonukleotide mit gleicher Sequenz von jeweils 24 Basen Länge immobilisiert. Synthese und Struktur der Oligonukleotide wurden in Beispiel 4 beschrieben. Beide Oligonukleotide verfügten über eine Aminomodifikation am 5'-Ende. Bei einem Oligonukleotid handelte es sich um unmodifizierte DNA, während das andere Oligonukleotid etwa in der Mitte des Moleküls eine Rückgratmodifizierung aufwies.

Die Rückgratmodifikation wurde durch Austausch einer Phosphodiesterbindung des Oligonukleotids gegen eine verbrückte Phosphothioat-Bindung erzeugt. Die dadurch entstandene Bindung unterscheidet sich von allen anderen Bindungen des jeweiligen Oligonukleotids. Sie kann daher selektiv angegriffen und gespalten werden, z.B. durch Schwermetallionen wie Quecksilberionen oder Silberionen.

Das Ablegen der Sonden erfolgte mit einer Eppendorf-Pipette (Einstellung 0,1 µl) aus einer jeweils 10 µM-Lösung der Oligonukleotide in 0,5 M Phosphatpuffer pH 8,0. Es wurden zwei Tropfen des Phosphothioat-Oligonukleotides und ein Tropfen des Phosphat-Oligonukleotides pro Chip abgelegt. Die Anordnung der Sonden ist in Abbildung 3a wiedergegeben.

Kovalente Verknüpfung des Aminolinkers der Oligonukleotide mit der Epoxidoberfläche der Arrays wurde erreicht, indem die abgelegten Tropfen bei Raumtemperatur eingetrocknet und

anschließend für 30 min bei 60 °C inkubiert wurden. Anschließend erfolgte ein Waschen der Chips nach folgendem Protokoll:

5 min in 100 ml H₂O bidest + 100 µl Triton x 100

2 x 2 min in 100 ml H₂O bidest

30 min in 100ml 100 mM KCl-Lösung

1 min in 100ml H₂O bidest spülen

trocknen

Anschließend wurde eine Hybridisierung mit einem vollständig komplementären, am 5'-Ende mit einem Cy3-Farbstoff markierten Oligonukleotid von 24 Basen Länge (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 50 µl einer 100 nM Lösung des komplementären Oligonukleotides in Hybridisierungspuffer (0,25M NaPO₄, 4,5% SDS, 1mM EDTA in 1xSSC) in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben. Nach Zugabe des Chips erfolgte ein Denaturierungsschritt für 5min bei 95°C. Die Hybridisierung erfolgte anschließend für 1 h bei 60°C. Die Chips wurden unter Schütteln in einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für je 10 min bei 30°C in 2xSSC+0,2%SDS und 2xSSC und anschließend für 10 min bei 20°C in 0,2xSSC (Maniatis et al., 1989) gewaschen. Das Volumen betrug jeweils 500 µl. Der Chip wurde für 5 min in einem Vakuum Konzentrator (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) getrocknet. Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte unter einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland). Die Anregung erfolgte im Auflicht mit einer Weißlichtquelle und einem für Cy 3 geeigneten Filtersatz. Die Signale wurden mit einer CCD-Kamera (PCO-Sensicam, Kehlheim, Deutschland) aufgezeichnet. Die Belichtungszeit betrug 1000ms.

An beiden Sondenmolekülen wurde ein Hybridisierungssignal mit gleicher Intensität detektiert (Abbildung 3b). Folglich zeigen Phosphothioat- und Phosphat-Oligonukleotide weitgehend vergleichbare Hybridisierungseigenschaften.

Beispiel 6:

Spezifische und effektive Spaltung der verbrückte Phosphothioat-Bindung in immobilisiertem Oligonukleotiden mit Silberionen

Das Experiment aus Beispiel 5 wurde wiederholt, allerdings wurde zuvor die Array-Oberfläche mit Silberionen behandelt. Dadurch wurden die Phosphothioat-Bindungen gespalten, während die Phosphatdiester-Oligonukleotidbindungen ungeschnitten blieben. Nach der Hybridisierung wurde an den nicht modifizierten Oligonukleotidsonden ein starkes Hybridisierungssignal detektiert, während das Signal an den Phosphothioat-modifizierten Sonden weitgehend verschwunden war. Das Prinzip des Experimentes ist in Abbildung 4 dargestellt.

Auf einer epoxidierten Pyrex-Glasoberfläche wurden zwei Oligonukleotide mit gleicher Sequenz von jeweils 24 Basen Länge immobilisiert. Synthese und Struktur der Oligonukleotide wurden in Beispiel 4 beschrieben. Beide Oligonukleotide verfügten über eine Aminomodifikation am 5'-Ende. Bei einem Oligonukleotid handelte es sich um unmodifizierte DNA, während das andere Oligonukleotid etwa in der Mitte des Moleküls eine Rückgratmodifizierung aufwies.

Die Rückgratmodifikation wurde durch Austausch einer Phosphodiesterbindung des Oligonukleotids gegen eine verbrückte Phosphothioat-Bindung erzeugt. Die dadurch entstandene Bindung unterscheidet sich von allen anderen Bindungen des jeweiligen Oligonukleotids. Sie kann daher selektiv angegriffen und gespalten werden, bspw. durch Schwermetallionen wie Quecksilberionen oder Silberionen.

Das Ablegen der Sonden erfolgte mit einer Eppendorf-Pipette , (Einstellung 0,1 µl) aus einer jeweils 10 µM-Lösung der Oligonukleotide in 0,5 M Phosphatpuffer pH 8,0. Es wurden zwei Tropfen des Phosphothiat-Oligonukleotides und ein Tropfen des Phosphat-Oligonukleotides pro Chip abgelegt. Die Anordnung der Sonden ist in Abbildung 3 wiedergegeben.

Kovalente Verknüpfung des Aminolinkers der Oligonukleotide mit der Epoxidoberfläche der Arrays wurde erreicht, indem die abgelegten Tropfen bei Raumtemperatur eingetrocknet und anschließend für 30 min bei 60 °C inkubiert wurden. Anschließend erfolgte ein Waschen der Chips nach folgendem Protokoll:

5 min in 100 ml H₂O bidest + 100 µl Triton x 100

2 x 2 min in 100 ml H₂O bidest

30 min in 100ml 100 mM KCl-Lösung

1 min in 100ml H₂O bidest spülen

trocknen

Zur selektiven Spaltung der Phosphothioat-Bindung wurden die Chips für 20 min bei 30°C in 100 µl Silbernitratlösung inkubiert. Die Konzentrationen betrugen 1 M, 200 mM 50 mM und 10 mM. Im Anschluß an die Silbernitratsspaltung wurden die Chips 2x 5min in entionisiertem Wasser gewaschen.

Anschließend erfolgte Hybridisierung mit einem vollständig komplementären, am 5'-Ende mit einem Cy3-Farbstoff markierten Oligonukleotid von 24 Basen Länge (MWG Biotech, Ebersberg). Zu diesem Zweck wurden 50µl einer 100nM Lösung des komplementären Oligonukleotides in Hybridisierungspuffer (0,25M NaPO₄, 4,5% SDS, 1mM EDTA in 1xSSC) in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben. Nach Zugabe des Chips erfolgte ein Denaturierungsschritt für 5min bei 95°C. Die Hybridisierung erfolgte anschließend für 1h bei 60°C. Die Chips wurden unter Schütteln in einem

Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für je 10min bei 30°C in 2xSSC+0,2%SDS und 2xSSC und anschließend für 10 min bei 20°C in 0,2xSSC (Maniatis et al., 1989) gewaschen. Das Volumen betrug jeweils 500µl. Der Chip wurde für 5 min in einem Vakuum Konzentrator (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) getrocknet. Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte unter einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland). Die Anregung erfolgte im Auflicht mit einer Weißlichtquelle und einem für Cy 3 geeigneten Filtersatz. Die Signale wurden mit einer CCD-Kamera (PCO-Sensicam, Kehlheim, Deutschland) aufgezeichnet. Die Belichtungszeit betrug 1000ms.


Im Vergleich zur Hybridisierung ohne Silbernitratbehandlung des Chips (Beispiel 5) war die Signalintensität an den Spots auf denen das Phosphothioat-Oligo immobilisiert wurde deutlich minimiert und liegt an der Detektionsgrenze, während die Signalintensität an dem mit dem Phosphat-Oligo belegten Spot unverändert blieb (siehe Abbildung 5) Folglich kann die Phosphothioatbindung selektiv und effizient geschnitten werden.

Beispiel 7:

Bindungsspaltung im hybridisierten Zustand und Untersuchung der Stabilität des gespaltenen Hybrid


In diesem Beispiel wurde dasselbe Sonden-Array wie in Beispiel 5 verwendet. Allerdings erfolgte zunächst Hybridisierung mit einem komplementären-markierten Oligonukleotid und erst anschließend eine Behandlung mit 50 mM AgNO₃ für eine Dauer von 30 Min. bei 0°C. Obwohl eine Bindungsspaltung des Phosphothioat-Oligonukleotids stattfand, konnte unter geeigneten Bedingungen, z.B. einer Erhöhung der Ionenstärke durch Zugabe von 1M NaNO₃, die Hybridisierung sowohl am Phosphothioat-modifizierten Oligonukleotid als auch am nicht modifizierten Phosphat-Oligonukleotid nachgewiesen werden. Nach Abschmelzen der Hybride und erneuter Hybridisierung mit dem komplementären 24mer unter stringenten

Bedingungen ist nur noch am ungespaltenen Phosphat-Oligonukleotid ein starkes Hybridisierungssignal detektierbar. Dies zeigt, daß auch im hybridisierten Zustand eine effiziente Spaltung der Phosphothioat-Bindung erfolgt, das Hybrid unter geeigneten Bedingungen aber hinreichend stabilisiert werden kann, um eine Dissoziation nach Bindungsspaltung zu unterbinden.



Auf einer epoxidierten Pyrex-Glasoberfläche wurden zwei Oligonukleotide mit gleicher Sequenz von jeweils 24 Basen Länge immobilisiert. Synthese und Struktur der Oligonukleotide wurden in Beispiel 4 beschrieben. Beide Oligonukleotide verfügten über eine Aminomodifikation am 5'-Ende. Bei einem Oligonukleotid handelte es sich um unmodifizierte DNA, während das andere Oligonukleotid etwa in der Mitte des Moleküls eine Rückgratmodifizierung aufwies.

Die Rückgratmodifikation wurde durch Austausch einer Phosphodiesterbindung des Oligonukleotids gegen ein verbrücktes Phosphothioat erzeugt. Die dadurch entstandene Bindung unterscheidet sich von allen anderen Bindungen des jeweiligen Oligonukleotids. Sie kann daher selektiv angegriffen und gespalten werden, bspw. durch Schwermetallionen wie Quecksilberionen oder Silberionen.



Das Ablegen der Sonden erfolgte mit einer Eppendorf-Pipette, (Einstellung 0,1 µl) aus einer jeweils 10 µM-Lösung der Oligonukleotide in 0,5 M Phosphatpuffer pH 8,0. Es wurden zwei Tropfen des Phosphothioat-Oligonukleotides und ein Tropfen des Phosphat-Oligonukleotides pro Chip abgelegt. Die Anordnung der Sonden ist in Abbildung 1a wiedergegeben. Kovalente Verknüpfung des Aminolinkers der Oligonukleotide mit der Epoxidoberfläche der Arrays wurde erreicht, indem die abgelegten Tropfen bei Raumtemperatur eingetrocknet und anschließend für 30 min bei 60 °C inkubiert wurden. Anschließend erfolgte ein Waschen der Chips nach folgendem Protokoll:

5 min in 100 ml H₂O bidest + 100 µl Triton x 100

2 x 2 min in 100 ml H₂O bidest

30 min in 100ml 100 mM KCl-Lösung


1 min in 100ml H₂O bidest spülen

trocknen

Anschließend erfolgte Hybridisierung mit einem vollständig komplementären, am 5'-Ende mit einem Cy3-Farbstoff markierten Oligonukleotid von 24 Basen Länge (MWG Biotech, Ebersberg). Zu diesem Zweck wurden 50µl einer 100nM Lösung des komplementären Oligonukleotides in Hybridisierungspuffer (0,25M NaPO₄, 4,5% SDS, 1mM EDTA in 1xSSC) in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben. Nach Zugabe des Chips erfolgte ein Denaturierungsschritt für 5min bei 95°C. Die Hybridisierung erfolgte anschließend für 1h bei 60°C. Die Chips wurden unter Schütteln in einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für je 10min bei 30°C in 2xSSC+0,2%SDS und 2xSSC und anschließend für 10 min bei 20°C in 0,2xSSC (Maniatis et al., 1989) gewaschen und 5 min in einem Vakuum Konzentrator (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die Hybridisierungssignale wurden unter einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) detektiert. Die Anregung erfolgte im Auflicht mit einer Weißlichtquelle und einem für Cy 3 geeigneten Filtersatz. Die Signale wurden mit einer CCD-Kamera (PCO-Sensicam, Kehlheim, Deutschland) aufgezeichnet. Die Belichtungszeit betrug 1000ms.

Zur selektiven Spaltung der Phosphothioat-Bindung wurden Chip für 20 min bei 0°C in 100µl 50mM AgNO₃, 1M NaNO₃, inkubiert. Im Anschluß an die Silbernitratenspaltung wurden die Chips 2x 5min in 500µl 1M NaNO₃ auf Eis gewaschen.

Der Chip wurde für 5 min in einem Vakuum Konzentrator (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) getrocknet. Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte wie oben beschrieben.



Anschließend wurde der Chip 3x für 10 min bei 95°C in 500µl entionisiertem Wasser gewaschen. Dadurch wurden die Hybride aufgeschmolzen. Es folgte eine zweite Hybridisierung. 50µl einer 100nM Lösung des vollständig komplementären, am 5'-Ende mit einem Cy3-Farbstoff markierten Oligonukleotid von 24 Basen Länge (MWG Biotech, Ebersberg) in Hybridisierungspuffer (0,25M NaPO₄, 4,5% SDS, 1mM EDTA in 1xSSC) wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben. Nach Zugabe des Chips erfolgte ein Denaturierungsschritt für 5min bei 95°C. Die Hybridisierung erfolgte anschließend für 1h bei 60°C. Die Chips wurden unter Schütteln in einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) für je 10min bei 30°C in 2xSSC+0,2%SDS und 2xSSC und anschließend für 10 min bei 20°C in 0,2xSSC (Maniatis et al., 1989) gewaschen. Das Volumen betrug jeweils 500µl. Anschließend wurden die Hybridisierungssignale wie oben beschrieben detektiert.




Abbildung 6 zeigt von links nach rechts Aufnahmen des selben Arrays nach verschiedenen Schritten des Experimentes: nach der Hybridisierung des Targets, nach Bindungsspaltung, sowie nach Abschmelzen der Hybride und erneuter Hybridisierung unter stringenten Bedingungen. Es zeigte sich einerseits, daß die Bindungsspaltung auch im hybridisierten Zustand effektiv verläuft: Nach Abschmelzen der Hybride und erneuter Hybridisierung ist nur am nicht spaltbaren Phosphat-Oligonukleotid ein starkes Hybridisierungssignal zu beobachten. An den Phosphothioat-Oligonukleotiden wird lediglich ein geringes Hybridisierungssignal an der Detektionsgrenze beobachtet, da die nach Bindungsspaltung an der Oberfläche verbleibenden 10mere unter den stringenten Hybridisierungsbedingungen keine stabilen Hybride bilden.

Beispiel 8:

Herstellung und Qualitätsüberprüfung eines Sonden-Arrays sowie Nachweis unter Verwendung des Sonden-Arrays

Es wird ein Array hergestellt, das insgesamt 52 gegen 8 *in vitro* RNAs gerichtete Sonden enthält. Die Sonden sind durch eine spaltbare Bindung und eine Markierung gekennzeichnet. Nach der Herstellung des Arrays wird die Qualität der Spots überprüft. Anschließend erfolgt Hybridisierung mit einem definierten Gemisch der 8 unmarkierten *in vitro* RNAs. Die labile Bindung wird geschnitten. Nach Waschen werden die am Array verbleibenden Signale detektiert. Die Signalintensitäten an den Spots entsprechen denen von Vergleichsexperimenten mit markierter RNA und unmarkierten, nicht spaltbaren Sonden.

Dies dokumentiert die Eignung des Verfahrens zum Nachweis von molekularen Wechselwirkungen auf Sonden-Arrays. In einer Versuchsreihe von je zehn Experimenten, nach dem klassischen und dem erfindungsgemäßen Detektionsverfahren zeigt sich, daß die Streuung der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren ermittelten Werte deutlich geringer ist als die der nach dem klassischen Verfahren gewonnenen.

a) Design und Herstellung der Sonden

Das Design der Sonden richtet sich nach der Sequenz der nachzuweisenden *in vitro* RNAs. Der Designprozeß berücksichtigt die Zugänglichkeit der Target-Region für eine potentielle Sonde, die möglichen Wechselwirkungen mit Teilen des gleichen Moleküls oder aber auch mögliche Wechselwirkungen zwischen Targetmolekülen in Lösung bzw. unerwünschten, die Spezifität negativ beeinflussenden Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Sonden. Es wird berücksichtigt, daß eine Spaltstelle eingefügt sein sollte. Diese Spaltstelle ist jeweils das T, welches am nächsten zur Mitte der Sonde angeordnet ist. Es weist eine 5'-Phosphothioat-Bindung auf. Neben den 52 Target-spezifischen Sonden (1-52) werden 3 Kontrollsonden

(Sonde 53-55) hergestellt. Sonde 53 und 54 besitzen keine spaltbare Bindung. Sonde 53 trägt eine Markierung, während Sonde 54 unmarkiert ist. Sonde 55 hybridisiert nicht mit den Targetsequenzen und dient zur Definition des experimentellen Hintergrundsignals.

Nach Festlegung der Sondensequenz werden diese synthetisch erzeugt wie z.B. in Beispiel 2 dargestellt. Die Sequenzen der Sonden sind in der folgenden Tabelle angegeben:

1	TCTAAAACCTGGCCAGCAATCATTC	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
2	GCCCGGGCATTCTCTCATTAACAT	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
3	TTCGAAAAGATTGCCTCCACATCAG	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
4	GTCTCATCTTTCTTCACGGAGCTGC	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
5	TGCTTGTTTGCTCTGTTCTTTTCA	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
6	TCCAGGTTTTCCAGGAGAGAATCCA	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
7	TCTGGGTCAGCTCCTTCTTAATGGC	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
8	TCTAGAGGATGCATTTGACATGCCA	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
9	TGTTACATTTGTGTTGAACTGCCCC	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
10	AATGAGATTGCCTTTGCAGTTAGGG	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
11	TTCTTTTGCCCTAGCTCCAAGTTCA	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
12	TCGTCCAACAAATACTTTGCGATCA	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
13	AATAGCTCTTTCAGCTGCTTCCTGC	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
14	TACAAATCCATAGCCCTTGGAACCA	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
15	TATGTTGCCTACTCCACTTTTGCGA	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
16	TGTTCAAATTTGCGCTTAAGTTCCG	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
17	TTTGTTTTCATTGAGCTCCTTTCC	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
18	TTACTTTCACACTTAAGGCAGGCCC	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
19	GACATGACTCGTGGAACCTGTGAAG	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
20	TAAATGGTGGTCTAGGAGCAGCTGG	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
21	TTGGCTAGGAGGATAGTATGCAGCA	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
22	AACACAGCGTGTTGCTAACACATCA	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
23	CTGTCCGCACCGTTCCACAGTATAA	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
24	CAGCAACATCTTAATGCACAGCCAC	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
25	AAGTTACAATGCAACAGCCTGCTGT	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
26	TCTAAAACCTGGCCAGCAATCATTCTGCCA	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
27	CTCTCCTGCTACAGCAGCCCGGGCATTCT	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
28	CGAAGGCAAAGCCCTTATGAACAGAGCAG	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
	C			
29	TCCCAATGAATACACGGGAGTTCATGGAGC	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat
30	GGATCTGTCTTGTTGGTAACGTTGCTGGCC	3'Cy3	5'NH ₂	Phosphothiotat

31	TCATCTTTCTTCACGGAGCTGCTGCTCTGC	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
32	TGGGTCAGCTCCTTCTTAATGGCCTGAAGG	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
33	AGAATTGAAGCCACTTTTGCCCCCTTCGTGA	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
34	TACATTTGTGTTGAACTGCCCCACACAGCA	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
35	TCAAAGGAAGTGAAAATGGGACTAGGCGC G	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
36	ATGTGCTTAAGAGTCATCCTCGCCATTGGC	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
37	AGCTCTTTCAGCTGCTTCCTGCGTCTCAA	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
38	ACTCCACTTTTGCGAAGTGATGGATCACGC	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
39	GAGACCACATGATGCGTACTGGCTTGCCCT	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
40	TCAAAATTCATGGTGTCCAAAGCACGCTCC	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
41	GCCGGCTGCTGGAAGTTCACATACGCGTAG	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
42	TTCAAATTTGCGCTTAAGTTCCGTCTGCCG	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
43	TTGAGCTCCTTTCCGTTTCATCTCATCCACA	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
44	AAGGCGCTCATCATCCATGTCTTCTCCAAA	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
45	CATGACTCGTGGAACCTGTGAAGAAGCTGG	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
46	ACTAAATGGTGGTCTAGGAGCAGCTGGGCG	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
47	AGCACCGGGCATATTTTGGAATGGATGAGG	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
48	ACCCTGAGCAGTCCAGCGAGGACTTGGTCT	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
49	CTACTCCTGCTGTCCGCACCGTTCCACAGT	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
50	TGCAGGAGTTCGCAATCCTCAGCAACATCT	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
51	TGCACAGCCACAAGTTACAATGCAACAGCC	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
52	TCAGGAACCTTTGACTGCTTCCATGTTGGC	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat
53	CCTCTGCAGACTACTATTAC	3'Cy3	5'NH2	
54	CCTCTGCAGACTACTATTAC		5'NH2	
55	CCTCTGCAGACTACTATTAC	3'Cy3	5'NH2	Phosphothiotat

b) Herstellung des Arrays

Arrays werden durch Spotten von spezifischen Sonden auf vorgefertigte Arrayingsubstrate erzeugt. Als Substrate werden epoxidierte Glasträger benutzt. Die oben aufgeführten targetspezifischen Sonden weisen neben der Phosphothioatmodifikation eine Cy3-Markierung am 3'-Ende der Sequenz und einen Aminolink am 5'-Terminus auf. Zusätzlich zu den targetspezifischen Sonden werden Sonde 55 als Hintergrundkontrolle und verschiedene Mischungsverhältnisse von Sonde 53 und 54 im Bereich von 1 bis 1: 10.000 als Eichreihe zur Kalibrierung der Ergebnisse immobilisiert. Die Sonden liegen in Mikrotiterplatten in einer Konzentration von 10µM in 0.5M Phosphatpuffer vor. Das Spotten der Sonden erfolgt mit

einem Spottingssystem der Fa. Biorobotics (Microgrid II). Nach der Deposition der Sonden auf der Oberfläche werden die Arrays 30min bei 60°C gebacken und gemäß dem nachfolgendem Protokoll gewaschen:

5 min in 600 ml H₂O bidest + 600 µl Triton x 100

2 x 2 min in 600 ml H₂O bidest

30 min in 600ml 100 mM KCl-Lösung

1 min in 600ml H₂O bidest spülen

trocknen

Die Sonden werden in 3 Subarrays jeweils in 3-facher Redundanz angeordnet.

c) Qualitätskontrolle

Die Qualität der immobilisierten Sonden wird durch Detektion des Fluoreszenzsignals auf dem Array durchgeführt. Die Signalintensitäten S_0 werden mit einem Laser Scanner vom Typ Scan array 4000 (GSI-Lumonics, USA) gemessen. Die Intensitäten werden auf einen Wert normiert, indem Einzelintensitäten mit einem Korrekturfaktor (k_a) versehen werden. Aus diesem läßt sich in direktem Zusammenhang die Anzahl der Moleküle pro Spot in Relation zu anderen Spots ableiten. Die Faktoren werden abgespeichert und dienen der Festlegung, ob das Array insgesamt bei vorgesehenen Analysen Verwendung finden kann. Die gemessenen Intensitäten/Spot werden in jedem Spot auf den Wert 1 normiert ($S_{0,n}/k_{a,n}=1$).

d) Hybridisierungstargets

Acht *in vitro*-RNAs mit den nachfolgenden Sequenzabschnitten werden verwendet:

RNA 1:

5'UCUAGAAAUAAUUUUGUUUAACUUUAAGAAGGAGAUUAUCAUAUGAACCCC
AGUGCCCCCAGCUACCCCAUGGCCUCGCUACGUGGGGGACCUCCACCCCGAC

GUGACCGAGGCGAUGCUCUACGAGAAGUUCAGCCCGGCCGGGCCCAUCCUCUC
CAUCCGGGUCUGCAGGGACAUGAUCACCCGCCGCUCCUUGGGCUACGCGUAUG
UGAACUUCCAGCAGCCGGCGGACGCGGAGCGUGCUUUGGACACCAUGAAUUUU
GAUGUUAUAAAGGGCAAGCCAGUACGCAUCAUGUGGUCUCAGCGUGAUCCAUC
ACUUCGCAAAAGUGGAGUAGGCAACAUAUUCAUUAAAAAUCUGGACAAAUCCA
UUGAUAAUAAAGCACUGUAUGAUACAUUUUCUGCUUUUGGUAACAUCUUA
UGUAAGGUGGUUUGUGAUGAAAAUGGUUCCAAGGGCUAUGGAUUUGUACACU
UUGAGACGCAGGAAGCAGCUGAAAGAGCUAUUGAAAAAUGAAUGGAAUGCU
CCUAAAUGAUCGCAAAGUAUUUGUUGGACGAUUUAAGUCUCGUAAAGAACGA
GAAGCUGAACUUGGAGCUAGGGCAAAGAAUUC3'

RNA 2:

5'AACUGCUUUCUGGGCAGCCUCUUUAGCUUGGUGGGCUUGUAGUACAGCUACA
GCUUCAUCAACCUUAGAACGGAGUGACUCUGGAGACUCGAGCAUAUGAAGAAG
UUCUGAAUUAUCAAUCCUCCAACAACAUGCCAGUGAUUUUACCAGCAAGAGUAG
GGUGCAUGGCUUGAAUAAGAGGAAACAGCCGUUCACCCAACAUUUGCUUUUGC
UCUUGAGGAGGGGCAGAUGCCAACAUGGAAGCAGUCAAGGUUCCUGACCUUG
UACAUGAACAGCAGGCUGUUGCAUUGUAACUUGUGGCUGUGCAUUAAGAUGU
UGCUGAGGAUUGCGAACUCCUGCAGCAUAUUUAUACUGUGGAACGGUGCGGAC
AGCAGGAGUAGCUGCAGCGGCUGCAGCUGCAGGACGUGGACCCAUUGUCUGUG
UUGAUGUGUUAGCAACACGCUGUGUUG3'

RNA 3:

5'UCUAGAAAAAUAAUUAGUGUUUAUAGUCUUAAGAUUUGUUUUCUAAAGUUG
AUACUGUGGGUUAUUUUUGUGAACAGCCUGAUGUUUGGGACCUUUUUUCCUC
AAAAUAAACAAGUCCUUAUUAACCAGGAAUUUGGAGAAAAAAAAGGAAU
UC3'

RNA 4:

5'GAAUUCCAAACCCGGGAGUAGGAGACUCAGAAUCGAAUCUCUUCUCCCUCCC
CUUCUUGUGAGAUUUUUUUGAUCUUCAGCUACAUUUUCGGCUUUGUGAGAAAC
CUUACCAUCAAAACACGAUGGCCAGCAACGUUACCAACAAGACAGAUCCUCGCU
CCAUGAACUCCCGUGUAUUCAUUUGGGAUUCUCAACACUCUUGUGGUCAAGAAA
UCUGAUGUGGAGGCAAUCUUUUCGAAGUAUGGCCAAAUUGUGGGCUGCUCUG
UUCAUAAGGGCUUUGCCUUCGUUCAGUAUGUUA AUGAGAGAAAUGCCCGGGCU
GCUGUAGCAGGAGAGGAUGGCAGAAUGAUUGCUGGCCAGGUUUUAGAUAUUA
ACCUGGCUGCAG3'

RNA 5:

5'GAAUUCACCAAUGUUUACAUCAAGAAUUUUGGAGAAGACAUGGAUGAUGAG
CGCCUUAAGGAUCUCUUUUGGCAAGUUUGGGCCUGCCUUAAGUGUGAAAGUAAU
GACUGAUGAAAGUGGAAAAUCCAAAGGAUUUGGAUUUGUAAGCUUUGAAAGG
CAUGAAGAUGCACAGAAAGCUGUGGAUGAGAUGAACGGAAAGGAGCUCAAUG
GAAAACAAAUUUAUGUUGGUCGAGCUCAGAAAAAGGUGGAACGGCAGACGGA
ACUUAAGCGCAAAUUUGAACAGAUGAACAAGAUAGGAUCACCAGAUACCAGG
GUGUUA AUUCUUUAUGUGAAAAAUUCUUGAUGAUGGUUAUUGAUGAUGAACGUCU
CCGGAAAGAGUUUUCUCCAUUUGGUACAAUCACUAG3'

RNA 6:

5'AGUGCAAAGGUUAUGAUGGAGGGUGGUCGCAGCAAAGGGUUUGGUUUUGUA
UGUUUCUCCUCCCCAGAAGAAGCCACUAAAGCAGUUACAGAAAUGAACGGUAG
AAUUGUGGCCACAAAGCCAUUGUAUGUAGCUUUAGCUCAGCGCAAAGAAGAGC
GCCAGGCUCACCUCACUAACCAGUAUAUGCAGAGAAUGGCAAGUGUACGAGCU
GUUCCCAACCCUGUAAUCAACCCCUACCAGCCAGCACCUCUUCAGGUUACUUC
AUGGCAGCUAUCCACAGACUCAGAACCGUGCUGCAUACUAUCCUCCUAGCCA
AAUUGCUCACUAAGACCAAGUCCUCGCUGGACUGCUCAGGGUGCCAGACCUC

AUCCA U U C C A A A A U A U G C C C G G U G C U A U C C G C C C A G C U G C U C C U A G A C C A C C A
U U U A G U A C U A U G A G A C C A G C U U C U U C A C A G G U U C C A C G A G U C A U G U C 3'

RNA 7:

5'CUGCAGCGGAGAUGUACGGCUCUCCUUCUUUGACUUGGACUAUGACUUUCAACG
GGACUAUUAUGAUAGGAUGUACAGUUACCCAGCACGUGUACCUCUCCUCCUC
CUAUUGCUCGGGCUGUAGUGCCCUCGAAACGUCAGCGUGUAUCAGGAAACACU
UCACGAAGGGGCAAAAGUGGCUUCAAUUCUAAGAGUGGACAGCGGGGAUCUUC
CAAGUCUGGAAAGUUGAAAGGAGAUGACCUUCAGGCCAUUAAGAAGGAGCUG
ACCCAGAUAAAACAAAAAGUGGAUUCUCUCCUGGAAAACCUGGAAAAAAUUGA
AAAGGAACAGAGCAAACAAGCAGUAGAGAUGAAGAAUGAUAAAGUCAGAAGAG
GAGCAGAGCAGCAGCUCCGUGAAGAAAGAUGAGACUAAUGUGAAGAUGGAGU
CUGAGGGGGGUGCAGAUGACUCUGCUGAGGAGGGGGACCUACUGGAUGAUGA
UGAUAAUGAAGAUCCGGGGGGAUGACCAGCUG3'

RNA 8:

5'cagcuggaguugaucaagggaugaaaaagaggcugaggaaggagaggauacagagacagcgccaauggcgaggau
gacucuuaagcacauagugggguuuagaaauuuaucccauuuuuuccuuuaccuagggcguugucuaagaucaaaauuu
ucaccgauccucucccuaguaucuuacgcacaugcucacuguuucucccauccuuguccuucccauguucauuaaauuc
auauugccccgcgccuagucccauuuuacacuuuccuuugacgcuccuaguaguuuuguuaagucuuaccugaaaauuuu
gcuuuuuauuuugauaccucuuuuagacuuuaacaauaaaaaggauguaugguuuuuaucaacugucuccaaaaauaauuc
cuuguuaugcaggggaguacaguucuuuucauucauacauaaguucaguaguugcuucccuaacugcaaaggcaaucuca
uuuaguugaguagcucuugaaagcagcuuugaguuaagaaguauuguguguuacaccucacauuagugugcuguguggg
gcaguucaacacaaauguaacaauuuuuuuugugaugagaguuggcaugucaaaugcauccucuaga3'

e) Hybridisierung der RNA

Die in vitro erzeugten RNAs werden über ein 5%iges denaturierendes PAA-Gel gereinigt (Maniatis et al., 1989), gefällt in entionisiertem Wasser aufgenommen, spektrophotometrisch vermessen und auf eine einheitliche Konzentration von 2 μ M eingestellt. Die RNAs werden äquimolar in 100 μ l Hybridisierungspuffer (0,25 M NaPO₄, 4,5% SDS, 1 mM EDTA in 1 x SSC) aufgenommen. Die Endkonzentration beträgt 40 nM. Die Hybridisierungslösung wird für 5 Minuten bei 80°C denaturiert. Die mit DNA belegte Fläche des Slides wird mit einer Hybridisierungskammer (Hybriwell, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gedeckelt. Das Slide wird auf einem Thermoschüttler mit Mikrotiterplattenaufsatz (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) auf 50°C vortemperiert. Anschließend wird die denaturierte Hybridisierungslösung eingefüllt und die Hybridisierungskammer nach Herstellerangaben verschlossen. Die Inkubation wird für 60 min bei 50°C fortgesetzt. Anschließend wird die Hybridisierungslösung abgenommen, die Hybridisierungskammer entfernt und die Slides unter Schütteln 10 min bei 30°C in 2 x SSC + 0,2% SDS und jeweils 10 Minuten bei 20°C in 2 x SSC und 0,2 x SSC gewaschen und mit Druckluft getrocknet.

f) Selektive Spaltung der Phosphothioat-Bindung

Zur selektiven Spaltung der Phosphothioat-Bindung werden die Arrays für 20 min bei 0°C unter Schütteln in einem Plastikgefäß in 2 ml 50 mM AgNO₃, 1 M NaNO₃, inkubiert, so daß die Arrays vollständig bedeckt sind. Im Anschluß an die Silbernitratspaltung werden die Chips 2x 5min in 50 ml 1M NaNO₃ auf Eis gewaschen. und anschließend unter Druckluft oder Argon getrocknet. Dabei ist darauf zu achten, daß die Lösung vollständig entfernt wird, da sonst Trocknungsråder entstehen. Die Hybridisierungssignale S₁ werden mit einem Laser Scanner vom Typ Scan array 4000 (GSI-Lumonics, USA) detektiert. Das Bild wird unter den identischen Detektor-Einstellungen erzeugt, die auch bei der Qualitätskontrolle Verwendung fanden. Abschließend wird unter Verwendung der in der Qualitätskontrolle gewonnenen Faktoren das Array auf die Sonden-spezifischen Intensitäten bezogen korrigiert. Es wird für jeden Spot die Gleichung ($S_{1n} \cdot k_{an} = S_{2n}$) angewandt.

Anschließend wird von allen Werten der Hintergrund abgezogen. Dieser stellt das Mittel der Signalintensitäten S_{2n} von allen Spots dar, die mit Oligonukleotid 55 belegt sind.

Es ergibt sich $S_{2n}' = S_{2n} - S_{2 \text{ Oligo55}}$.

Die korrigierten Werte geben ein weitaus realistischeres Bild der Intensitäts- und damit der Konzentrationsverteilung der Targets in Lösung. Dies ist insbesondere bei quantitativen Messungen der differentiellen Genexpression von Bedeutung, ebenfalls aber bei der Abschätzung der Validität von Signalen. Das normierte, auf den Spots verbleibende Signal ist direkt proportional zur Menge der in Lösung vorliegenden Targets.

Beim Vergleich der Intensitäten verschiedener Arrays wird eine weitere Skalierung vorgenommen. Es wird ein Faktor errechnet, der die Unterschiede der Signalintensitäten der Eichspots, in denen Oligo 53 und 54 in unterschiedlichen molaren Verhältnissen gemischt wurde wiedergibt. Bei der Bestimmung des Skalierungsfaktors werden nur die Eichspots berücksichtigt, die im dynamischen Bereich der Detektion liegen.

Die auf jedem Array bestimmten Werte S_{2n}' werden mit dem Skalierungsfaktor multipliziert.

g) Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird unter Zuhilfenahme des Softwarepakets Iconoclust durchgeführt, das unter Anwendung von Programmscripten sowohl die Bestimmung der oben genannten Faktoren gestattet als auch deren Einrechnung bei der Anwendung der genannten Arrays. Grundsätzlich ist dies auch mit einem Tabellenkalkulationsprogramm möglich.

Abbildungen:

Abbildung 1: Schema für die Synthese des Phosphoramidit-Bausteins.

Abbildung 2: Gelbild, das den quantitativen Verlauf der Spaltung des modifizierten Oligonukleotides darstellt.

Von links nach rechts:

1. 5'-TTG ACG GTA TAT CT-3' (14mer-Kontrolle) + Farbstoff (XC + BP)
2. 5'-AGC CCT TAC T-3' (10mer-Kontrolle)
3. Modelloligonukleotid 5'-AGC CCT TAC TT GAC GGT ATA TCT-3
4. Leer
5. Modelloligonukleotid (unmodifiziert)
6. Spaltungsreaktion
7. Spaltungsreaktion
8. Modelloligonukleotid (unmodifiziert)
9. Spaltungsreaktion
10. Spaltungsreaktion
11. Modelloligonukleotid (modifizierte P-S-Bindung)
12. Spaltungsreaktion
13. Spaltungsreaktion
14. Modelloligonukleotid (modifizierte P-S-Bindung)
15. Spaltungsreaktion
16. Spaltungsreaktion

Abbildung 3:

- a) Anordnung der Sonden bei dem in Beispiel 5 beschriebenen Experiment.
- b) Detektion eines Hybridisierungssignal mit gleicher Intensität an beiden Sondenmolekülen in Beispiel 5.

Abbildung 4: Prinzip des Experiments von Beispiel 6.

Abbildung 5: Hybridisierungssignal nach Spaltung des Phosphothioates mit unterschiedlichen Konzentrationen Silbernitrat.

Abbildung 6: Aufnahmen des selben Arrays nach verschiedenen Schritten des Experimentes. Von links nach rechts: nach der Hybridisierung des Targets, nach Bindungsspaltung, sowie nach Abschmelzen der Hybride und erneuter Hybridisierung unter stringenten Bedingungen.

Abbildung 7: Schematische Darstellung der erfindungsgemäßen Verfahren.

A N S P R Ü C H E

1. Sonden-Array zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von Targetmolekülen in einer Probe durch molekulare Wechselwirkungen zwischen Sondenmolekülen und Targetmolekülen auf dem Sonden-Array, umfassend eine Array-Oberfläche und an definierten Stellen auf der Array-Oberfläche immobilisierte Sondenmoleküle,

dadurch gekennzeichnet, daß die Sondenmoleküle mindestens eine Markierung aufweisen und innerhalb des Sondenmoleküls zwischen dem Ort ihrer Immobilisierung auf der Array-Oberfläche und der Markierung mindestens eine selektiv spaltbare Bindung aufweisen.

2. Sonden-Array nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß die Sondenmoleküle ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Oligonukleotiden, Peptiden, Proteinen und deren Analoga.

3. Sonden-Array nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß die Sondenmoleküle Oligonukleotide sind.

4. Sonden-Array nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet, daß die Sondenmoleküle Oligonukleotide mit einer Länge von 10 bis 100 Basen, vorzugsweise 15 bis 50 Basen und besonders bevorzugt 20 bis 30 Basen Länge sind.

5. Sonden-Array nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß sich die selektiv spaltbare Bindung ungefähr in der Mitte zwischen dem Ort der Immobilisierung des Sondenmoleküls auf der Array-Oberfläche und der Markierung des Sondenmoleküls befindet.

6. Sonden-Array nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die selektiv spaltbare Bindung nicht durch enzymatische Methoden selektiv gespalten werden kann.

7. Sonden-Array nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die selektiv spaltbare Bindung durch chemische und/oder physikalische Methoden selektiv gespalten werden kann.

8. Sonden-Array nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die selektiv spaltbare Bindung durch Zugabe von Säureanionen, Basekationen, Fluorid- und/oder Schwermetallionen wie Quecksilber- und/oder Silberionen selektiv gespalten werden kann.

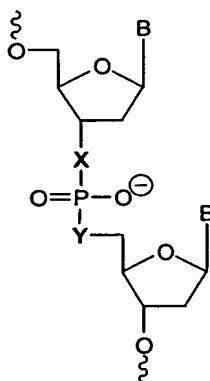
9. Sonden-Array nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die selektiv spaltbare Bindung photolytisch selektiv gespalten werden kann.

10. Sonden-Array nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß die Sondenmoleküle eine Nukleinsäure der Formel A_1-S-A_2 umfassen, wobei S eine Nukleinsäure ist, die mindestens eine selektiv spaltbare Bindung umfaßt und A_1 und A_2 beliebige Nukleinsäuren oder Nukleinsäureanaloga sind.

11. Sonden-Array nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet, daß S ein Nukleotid-Dimer ist, das durch eine selektiv spaltbare Bindung verbrückt ist.

12. Sonden-Array nach Anspruch 10 oder 11,
dadurch gekennzeichnet, daß S aus der Gruppe bestehend aus den folgenden Dimeren mit
den Formeln I und II ausgewählt ist:

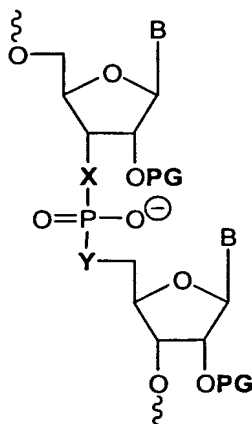
a)



I,

wobei X und Y unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus O, NH und S, mit der Maßgabe, daß X und Y nicht gleichzeitig O sind; und B für eine Nucleobase wie die Purin-Derivate Adenin und Guanin sowie die Pyrimidine Cytosin und Thymin steht,

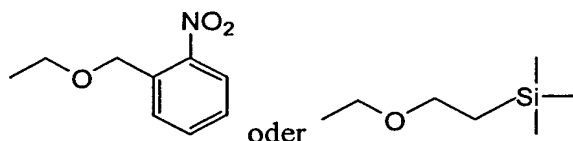
b)



II,

wobei X und Y unabhängig voneinander ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus O, NH und S, mit der Maßgabe, daß X und Y nicht gleichzeitig O sind, wenn PG keine labile Schutzgruppe ist; B für eine Nucleobase wie die Purin-Derivate Adenin und Guanin sowie die Pyrimidine Cytosin und Uracil steht; und PG ausgewählt ist der Gruppe bestehend aus H und

labilen Schutzgruppen wie



13. Sonden-Array nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die selektiv spaltbare Bindung eine Phosphothioatbindung ist.

14. Sonden-Array nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Markierung eine detektierbare Einheit ist, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Fluoreszenzmarkern, Lumineszenzmarkern, Metallmarkern, Enzymmarkern, radioaktiven Markern, polymeren Markern und Nukleinsäuren, die durch Hybridisierung mit einer markierten Reportersonde detektierbar sind.

15. Sonden-Array nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß die detektierbare Einheit über eine Ankergruppe an die Sondenmoleküle gekoppelt ist, wobei die Ankergruppe vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Digoxigenin und Biotin.

16. Sonden-Array nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß auf mindestens einem Array-Element des Sonden-Arrays Sondenmoleküle angeordnet sind, die mindestens eine Markierung und keine selektiv spaltbare Bindung aufweisen.

17. Sonden-Array nach Anspruch 16,

dadurch gekennzeichnet, daß die nicht mit einer selektiv spaltbaren Bindung versehenen Sondenmoleküle aus Molekülen ausgewählt sind, die von ihrer chemischen Natur den mit einer selektiv spaltbaren Bindung versehenen Sondenmolekülen entsprechen.

18. Sonden-Array nach Anspruch 16 oder 17,

dadurch gekennzeichnet, daß die nicht mit einer selektiv spaltbaren Bindung versehenen Sondenmoleküle Oligonukleotide mit einer definierten oder randomisierten Sequenz sind.

19. Sonden-Array nach einem der vorangehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, daß auf mindestens einem Array-Element detektierbare Einheiten ohne Verknüpfung mit einem Sondenmolekül angeordnet sind.

20. Sonden-Array nach einem der Ansprüche 16 bis 19,

dadurch gekennzeichnet, daß die nicht mit einer selektiv spaltbaren Bindung versehenen Sondenmoleküle bzw. die nicht mit einem Sondenmolekül verknüpften detektierbaren Einheiten auf verschiedenen Array-Elementen angeordnet sind, die sich in ihrem Markierungsgrad unterscheiden.

21. Sonden-Array nach einem der vorangehenden Ansprüche,

dadurch gekennzeichnet, daß auf mindestens einem Array-Element Sondenmoleküle angeordnet sind, die keine oder zumindest keine spezifische Affinität zu Targetmolekülen aufweisen.

22. Sonden-Array nach Anspruch 21,

dadurch gekennzeichnet, daß die keine oder zumindest keine spezifische Affinität für Targetmoleküle aufweisenden Sondenmoleküle Oligonukleotide mit einer definierten oder randomisierten Sequenz sind.

23. Sonden-Array nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß auf mindestens einem Array-Element Sondenmoleküle angeordnet sind, die eine spezifische Affinität für zu der Probe vorzugsweise in bekannter Konzentration extern zugegebene Targetmoleküle aufweisen.

24. Sonden-Array nach einem der vorangehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß über die gesamte Fläche des Arrays Array-Elemente verteilt sind, auf denen Sondenmoleküle angeordnet sind, die eine Markierung und eine selektiv spaltbare Bindung, angeordnet zwischen Markierung und Immobilisierungsstelle der Sonde auf der Oberfläche, aufweisen, sowie eine spezifische Affinität zu einem extern zugegebenen Targetmolekül oder zu einem in der Probe in ausreichender Konzentration vorhandenen Targetmolekül aufweisen.

25. Verfahren zur Herstellung eines Sonden-Arrays gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Synthese von Sondenmolekülen, die eine Markierung tragen und zwischen der Stelle ihrer Immobilisierung auf der Array-Oberfläche und der Markierung eine selektiv spaltbare Bindung aufweisen; und
- b) ortsspezifische Immobilisierung der Sondenmoleküle über eine definierte Position innerhalb der Sondenmoleküle auf der Array-Oberfläche.

26. Verfahren zur Herstellung eines Sonden-Arrays gemäß einem der Ansprüche 1 bis 24 durch in situ-Synthese der Sondenmoleküle auf vorbestimmten Positionen der Array-Oberfläche, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellung einer Array-Oberfläche, die mit geeigneten Reagenzien aktiviert werden kann bzw. mit Schutzgruppen versehen ist;
- b) Kopplung bzw. Immobilisierung von Untereinheiten der zu synthetisierenden Sondenmoleküle an vorbestimmte Stellen auf der Array-Oberfläche vorzugsweise durch

Deposition der Untereinheit, wobei die Kopplung an vorbestimmten Stellen vorzugsweise durch Aktivierung bzw. Entschützung der Array-Oberfläche und anschließende Kopplung der Untereinheit erfolgt;

c) in situ-Synthese der Sondenmoleküle aufbauend auf den in Schritt b) gekoppelten bzw. immobilisierten Untereinheiten unter Einbau einer Markierung und einer selektiv spaltbaren Bindung zwischen der Stelle der Immobilisierung der Sondenmoleküle auf der Array-Oberfläche und der Markierung.

27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26,

dadurch gekennzeichnet, daß die Immobilisierung der Sonden auf der Array-Oberfläche kovalent erfolgt.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 27,

dadurch gekennzeichnet, daß die Synthese von Oligonukleotidsonden nach dem Phosphoramiditverfahren erfolgt.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 28,


dadurch gekennzeichnet, daß die selektiv spaltbare Bindung durch Verbrückung von zwei Nukleosiden mit einer Phosphothioatgruppe erzeugt wird.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 29,

dadurch gekennzeichnet, daß ein abgestufter Markierungsgrad auf einem Array-Element dadurch erreicht wird, daß während der Synthese eine Mischung aus markierten Monomeren und unmarkierten Monomeren gleicher Reaktivität vorzugsweise in einem definierten Verhältnis zugegeben wird.


31. Verfahren zur Überprüfung der Qualität der Sonden-Arrays nach einem der Ansprüche 1 bis 24 bzw. der nach einem der Ansprüche 25 bis 30 hergestellten Sonden-Arrays, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellung eines Sonden-Arrays gemäß einem der Ansprüche 1 bis 24;
- b) Detektion der auf der Array-Oberfläche immobilisierten synthetisierten Sondenmoleküle in Form von Signalintensitäten.



32. Verfahren nach Anspruch 31,
dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion über direkt zu detektierende Marker, insbesondere Fluoreszenzmarker und/oder radioaktive Marker, erfolgt.

33. Verfahren nach Anspruch 31 oder 32,
dadurch gekennzeichnet, daß durch die Detektion die Belegungsdichte der Array-Elemente mit Sondenmolekülen anhand der Intensität der durch die Marker erzeugten Signale bestimmt wird.



34. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 33,
dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion mit einem bildgebenden Verfahren erfolgt, welches die Signalintensitäten in Form von Graustufen abbildet.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 34,
dadurch gekennzeichnet, daß die Ergebnisse der Qualitätsüberprüfung in einer Datenbank gespeichert werden.

36. Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von Targetmolekülen aus einer zu untersuchenden Probe durch molekulare Wechselwirkungen zwischen Sondenmolekülen und Targetmolekülen auf Sonden-Arrays, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellung eines Sonden-Arrays gemäß einem der Ansprüche 1 bis 24;
- b) gegebenenfalls Detektion der auf der Array-Oberfläche immobilisierten bzw. synthetisierten Sondenmoleküle in Form von Signalintensitäten;
- c) Inkubation des Sonden-Arrays mit der zu untersuchenden Probe;
- d) gegebenenfalls Waschen unter Bedingungen, unter denen eine spezifische Wechselwirkung zwischen Target- und Sondenmolekül weitgehend stabil bleibt und unspezifisch gebundene Targets entfernt werden;
- e) gegebenenfalls erneute Detektion in Form von Signalintensitäten;
- f) selektive Spaltung der selektiv spaltbaren Bindung in den Sondenmolekülen;
- g) gegebenenfalls Waschen, um nicht durch eine Wechselwirkung mit Targetmolekülen an der Array-Oberfläche zurückgehaltene markierte Sondenmolekül-Fragmente zu entfernen;
- h) Detektion der durch eine Wechselwirkung mit Targetmolekülen auf der Array-Oberfläche verbliebenen markierten Sondenmolekül-Fragmente in Form von Signalintensitäten; und
- i) gegebenenfalls Normierung der in Schritt h) erhaltenen Signalintensitäten.

37. Verfahren nach Anspruch 36,

dadurch gekennzeichnet, daß die Normierung in Schritt i) durch mindestens eine der folgenden Methoden erfolgt:

- a) Normierung durch mathematische Verknüpfung der in Schritt h) erhaltenen Signalintensitäten mit einem Korrekturfaktor, der anhand der Signalintensitäten aus Schritt b) nach Anspruch 36 bzw. aus Schritt b) nach Anspruch 31 ermittelt wird;
- b) Normierung durch mathematische Verknüpfung der in Schritt h) erhaltenen Signalintensitäten mit einem Korrekturfaktor, der anhand der Signalintensitäten von Kontroll-Array-Elementen ermittelt wird, die über die gesamte Fläche des Arrays verteilt sind und auf denen Sondenmoleküle angeordnet sind, die eine Markierung und eine selektiv spaltbare Bindung, angeordnet zwischen Markierung und Immobilisierungsstelle des Sondenmoleküls auf der Oberfläche, aufweisen, sowie eine spezifische Affinität zu einem extern zugegebenen

Targetmolekül oder zu einem in der Probe in ausreichender Konzentration vorhandenen Targetmolekül aufweisen;

c) Normierung durch Subtraktion der in Schritt h) erhaltenen Signalintensitäten mit von Hintergrund-Array-Elementen detektierten Signalintensitäten, auf denen Sondenmoleküle angeordnet sind, die keine bzw. keine detektierbare Wechselwirkung mit Targetmolekülen aus der Probe eingehen; und/oder

d) Normierung durch Vergleich der für ein Array-Element erhaltenen Signalintensität mit Signalintensitäten von Detektionsstandard-Array-Elementen, auf denen markierte, jedoch nicht mit einer selektiv spaltbaren Bindung versehene Sondenmoleküle angeordnet sind, wobei sich der Markierungsgrad der Detektionsstandard-Array-Elemente vorzugsweise in charakteristischer Weise unterscheidet.

38. Verfahren nach Anspruch 36 oder 37,
dadurch gekennzeichnet, daß die selektiv spaltbare Bindung durch chemische und/oder physikalische Methoden selektiv gespalten wird.

39. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 38,
dadurch gekennzeichnet, daß die selektiv spaltbare Bindung durch Zugabe von Säureanionen, Basekationen, Fluorid- und/oder Schwermetallionen wie Quecksilber- und/oder Silberionen selektiv gespalten wird.

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 39,
dadurch gekennzeichnet, daß die Targetmoleküle vor der Inkubation durch ein enzymatisches, physikalisches oder chemisches Verfahren fragmentiert werden.

41. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 40,
dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubation mit einer Probe von markierten Targets erfolgt.

42. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 41,
dadurch gekennzeichnet, daß die Spaltung der selektiv spaltbaren Bindung bei hoher Ionenstärke und/oder niedriger Temperatur erfolgt.

43. Kit zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von Targetmolekülen aus einer Probe durch molekulare Wechselwirkungen zwischen Sondenmolekülen und Targetmolekülen auf Sonden-Arrays, umfassend die folgenden Bestandteile:

- a) ein Sonden-Array nach einem der Ansprüche 1 bis 24;
- b) Reagenzien für die selektive Spaltung der selektiv spaltbaren Bindung in den Sondenmolekülen;
- c) Hybridsierungspuffer; und
- d) gegebenenfalls Waschpuffer.

44. Kit nach Anspruch 43,
dadurch gekennzeichnet, daß die Reagenzien ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus Schwermetallionen und Enzymen.

45. Kit nach Anspruch 44,
dadurch gekennzeichnet, daß die Schwermetallionen ausgewählt werden aus Quecksilber- und Silberionen.

46. Kit nach einem der Ansprüche 43 bis 45,
dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich eine Reaktionskammer umfaßt.

47. Kit nach einem der Ansprüche 43 bis 46,
dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich eine Detektionsvorrichtung umfaßt.

48. Kit nach einem der Ansprüche 43 bis 47,

dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich eine Temperatursteuereinheit umfaßt.

49. Kit nach einem der Ansprüche 43 bis 48,
dadurch gekennzeichnet, daß der Sonden-Array sowie die Bestandteile gemäß einem der Ansprüche 46 bis 48 als hochintegrierte autonome Einheit vorliegen.

50. Verwendung des Sonden-Arrays nach einem der Ansprüche 1 bis 24 bzw. des Verfahrens nach einem der Ansprüche 36 bis 42 bzw. des Kits nach einem der Ansprüche 43 bis 49 zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von Targetmolekülen aus einer Probe durch molekulare Wechselwirkungen zwischen Sondenmolekülen und Targetmolekülen auf Sonden-Arrays.

51. Verwendung nach Anspruch 50 zur Untersuchung des genotypischen Zustands von Zellen.

52. Verwendung nach Anspruch 50 zur Untersuchung des physiologischen Zustands von Zellen.

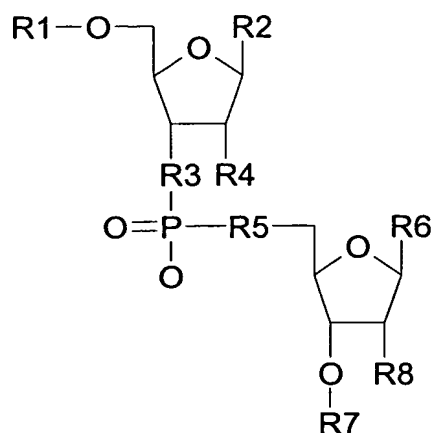
53. Verfahren zur Herstellung von für die DNA-Synthese geeigneten Monomer-Bausteinen, die zur Erzeugung einer labilen Bindung in Sondenmolekülen dienen können, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Veresterung der 5'-OH-Gruppe eines Nukleosids mit einer als Abgangsgruppe geeigneten Säure;
- b) Umsetzung des Esters mit einem Thioester;
- c) Verseifung des Thioesters zu einem Thiol;
- d) Schutz der Thiol-Funktion mit für die Phosphotriester- oder Phosphoramidit-Methode geeigneten Schutzgruppen;

e) Aktivierung des geschützten Thiols an der 3'-Position mit der Phosphotriester- oder Phosphoramidit-Methode.

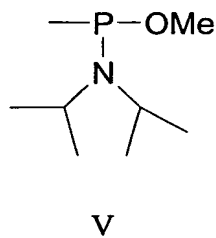
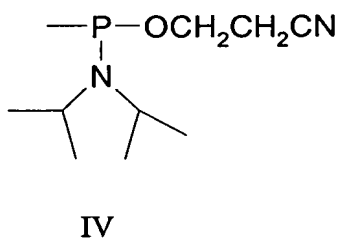
54. 5'-S-(Dimethoxytrityl)-mercapto-5'-deoxynucleosid-3'-O-(2-cyanoethyl, N,N'-diisopropyl-phosphit.

55. Nukleotid-Dimere mit der folgenden Formel III:



III,

wobei R1 vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus DMTr-, MMTr-, Tr-, 9-Phenylxanthen-9-yl-, Pixyl- und Silyl-Gruppen; R2 und R6 unabhängig voneinander vorzugsweise stehen für A, G, C, T und U; R3 vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus O, S und NH; R4 vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H, OH und O-Alkyl; R5 vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus O, S und NH; R8 vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus H, OH und O-Alkyl; und R7 vorzugsweise aus einer der beiden folgenden Gruppen mit den Formeln IV und V ausgewählt ist:



Z U S A M M E N F A S S U N G

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Sondenmolekülen und Targetmolekülen auf Sonden-Arrays, bei dem auf die Markierung der Targetmoleküle verzichtet werden kann. Ferner betrifft die Erfindung für ein derartiges Verfahren geeignete Sonden-Arrays und Kits sowie ein Verfahren zur Herstellung, Qualitätsüberwachung und Normierung von Sonden-Arrays.

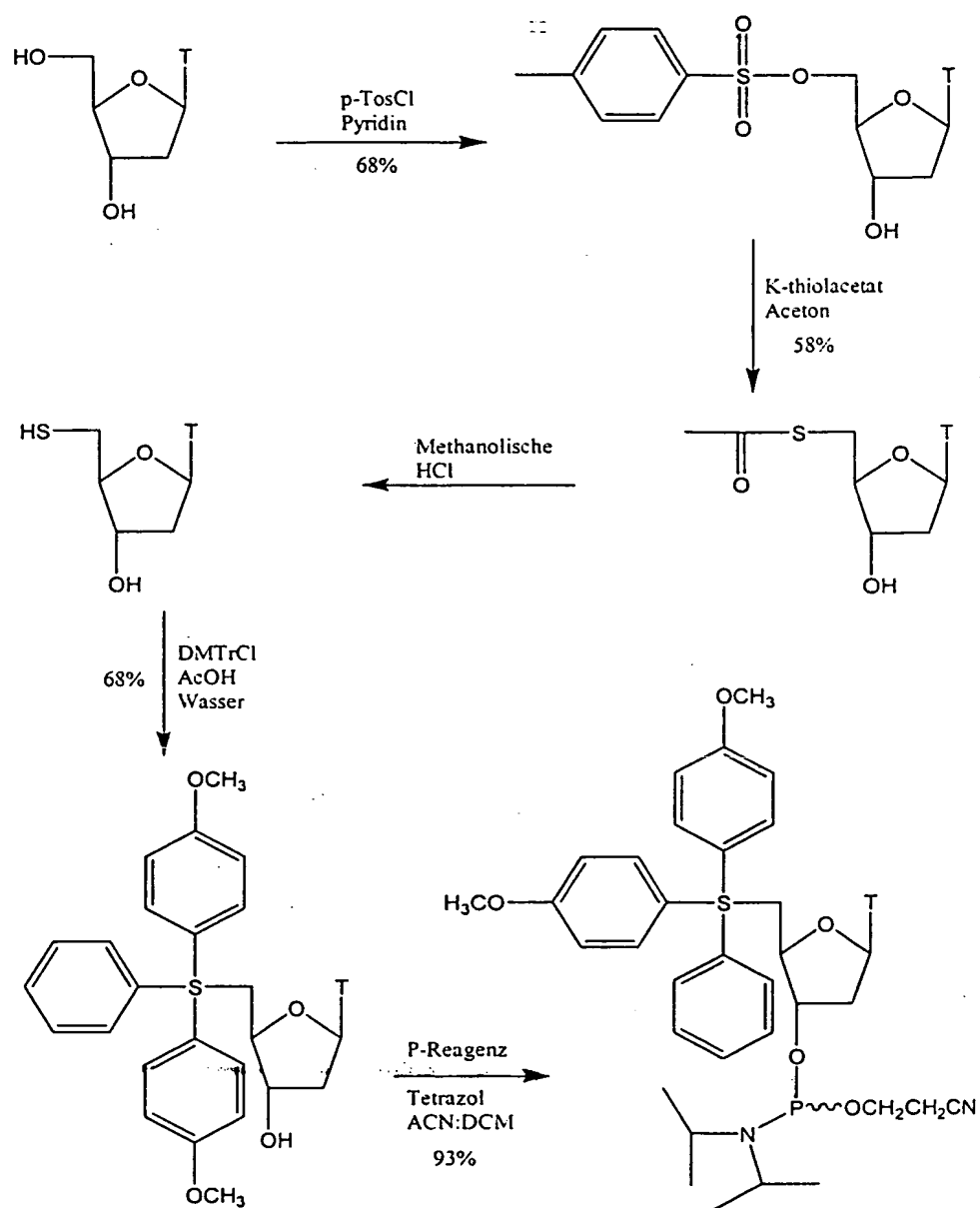


Abb. 1

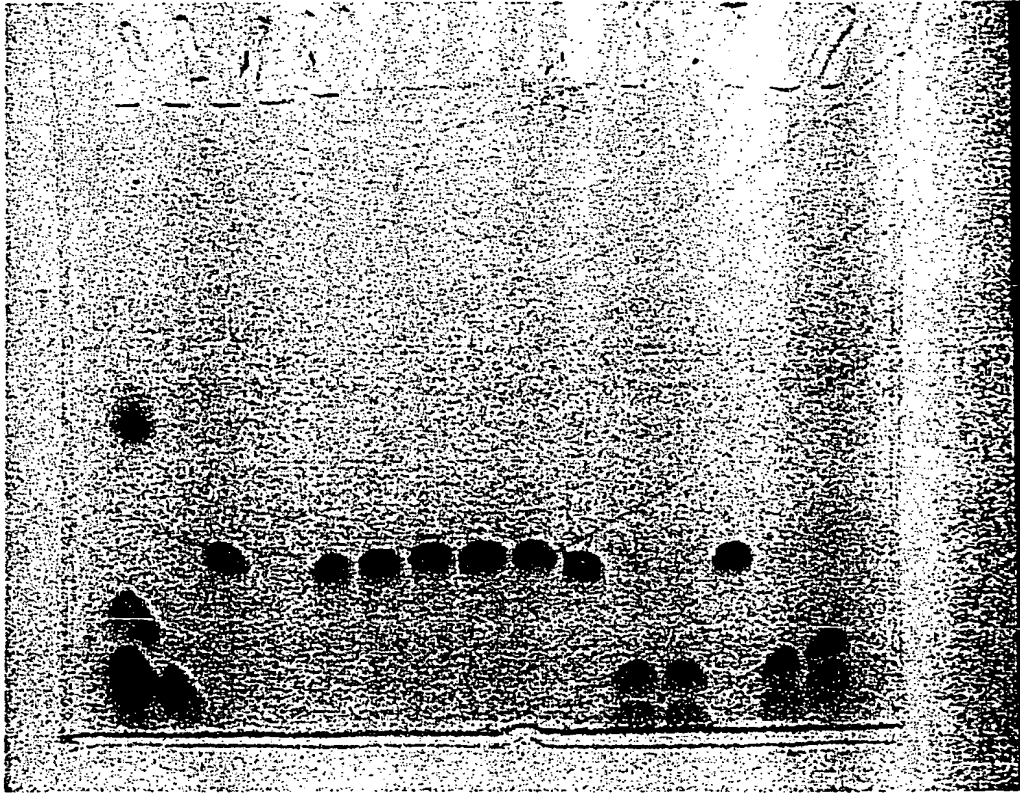


Abb. 2

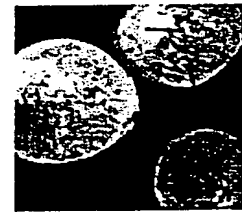
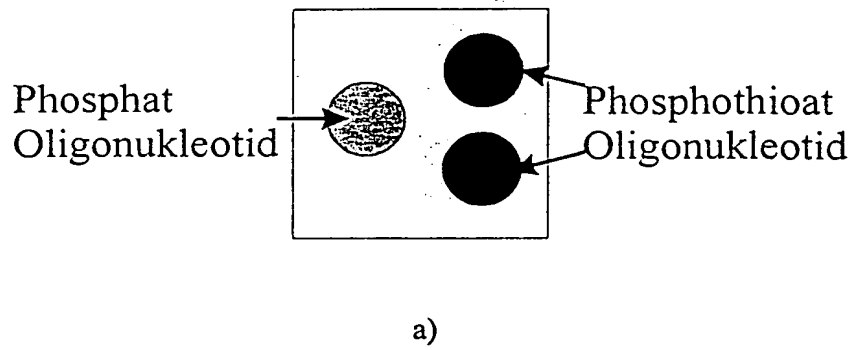


Abb. 3

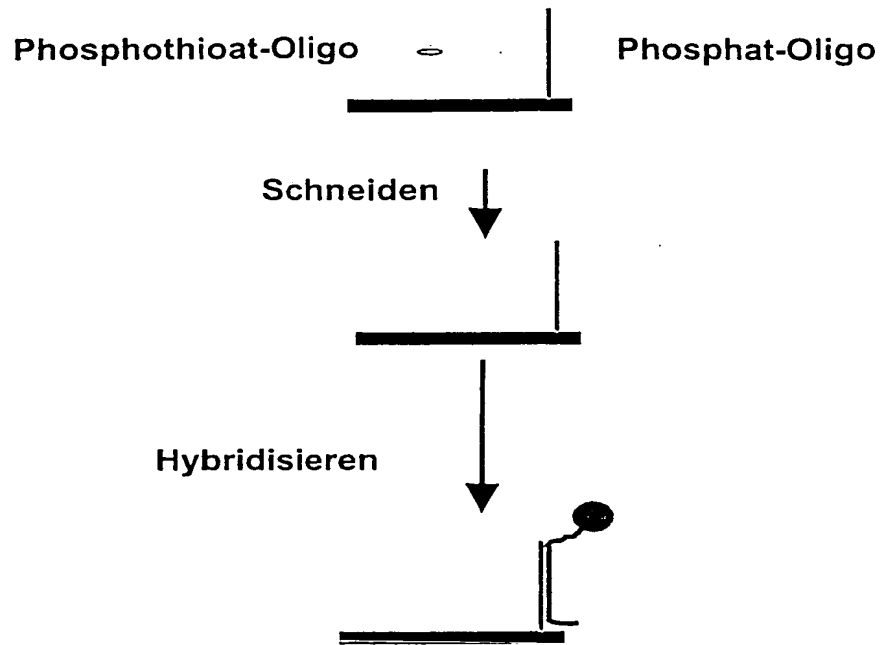
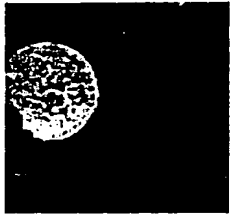


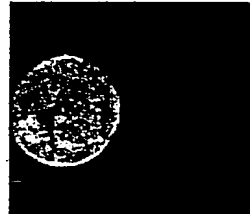
Abb. 4



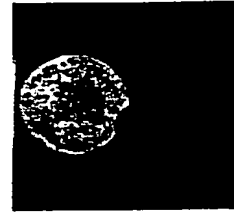
1M



200mM

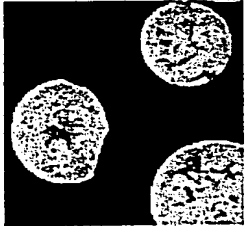


50mM

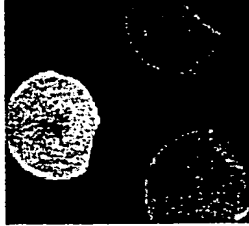


10mM

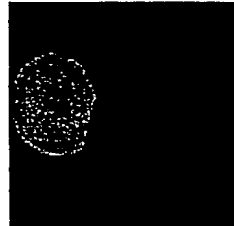
Abb. 5



Hybridisierung
Waschen



Schneiden in
50mM AgNO_3 ,
1M NaNO_3 bei
0°C



Hybridisierung
Waschen

Abb. 6

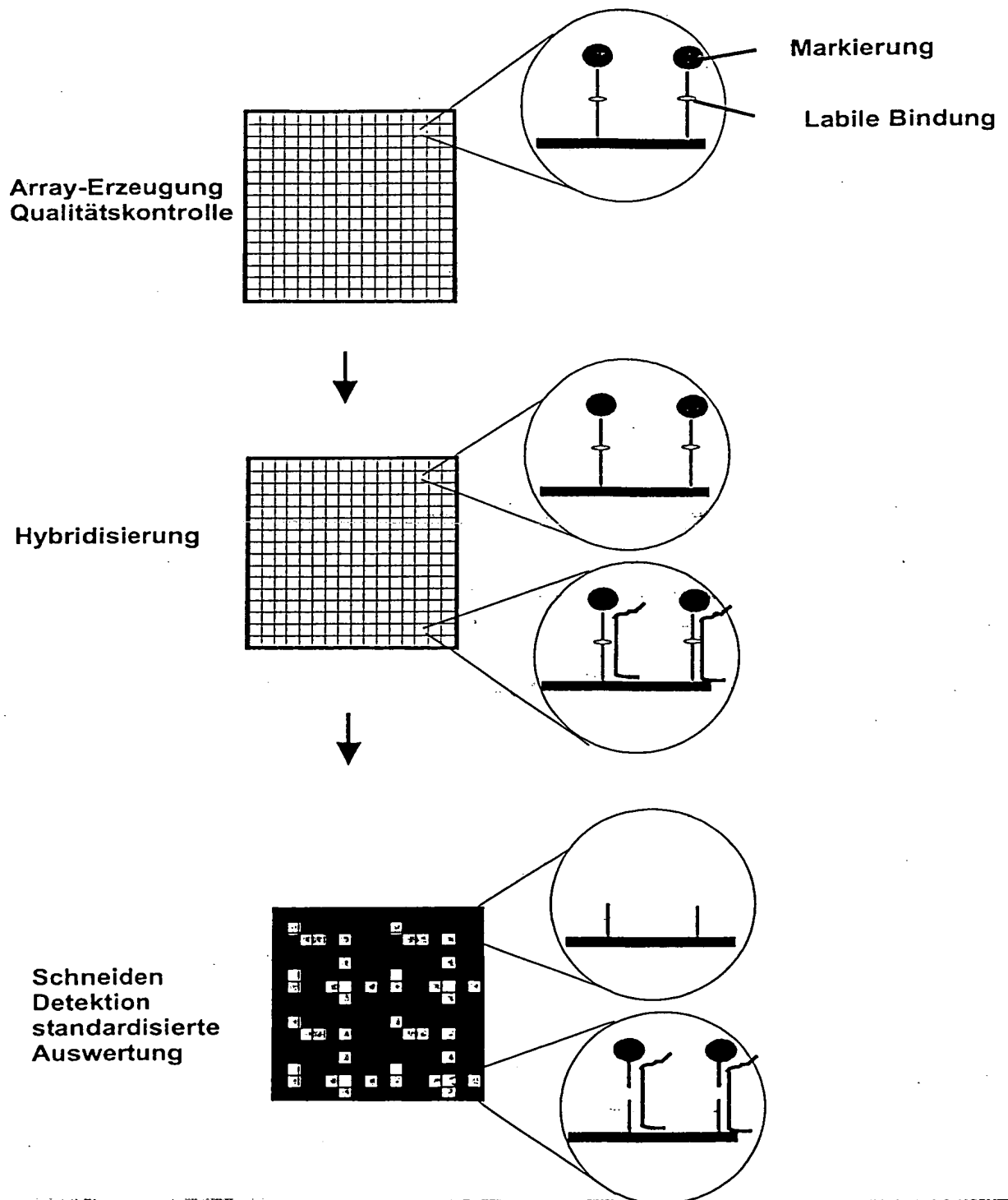


Abb. 7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.